

DURATION ON LIMOUSIN X-Y SPERMATOZOA QUALITY AND PROPORTION WHICH WAS RESULTED BY SEXING PERCOLL DENSITY GRADIENT USING CEP-2+10%KT DILUENT

Fatahillah¹⁾, T. Susilawati²⁾ and N. Isnaini²⁾

- 1). Student at Faculty of Animal Husbandry Brawijaya University.
- 2). Lecturer in Faculty of Animal Husbandry Brawijaya University.

ABSTRACT

The study aimed to investigate the effect of long duration of centrifugation on quality and proportion of Limousin's X-Y spermatozoa was resulted by sexing percoll density gradient us CEP-2 + 10% diluent of egg yolk. The research method used was experimental method. In this research, experiments were divided into two treatments consist of five minutes and seven minutes of centrifugation using the same speed that was 2250 rpm (850 G). The result of research showed the treatments of 5 minutes centrifugation has better quality than 7 minutes it is covered concentration, viability and total motile spermatozoa, whereas abnormality and motility is better in 7 minutes centrifugation than 5 minutes. Proportion of X spermatozoa in the 5 and 7 minutes centrifugation treatment did not significant different ($P>0,05$) those are 78,6% and 76,5%.

Key words : Centrifugation, Sexing Gradien Densitas Percoll, Spermatozoa Quality, Spermatozoa Proportion, CEP-2+10%KT

PENGARUH LAMA SENTRIFUGASI TERHADAP KUALITAS DAN PROPORSI SPERMATOZOA X-Y SAPI LIMOUSIN HASIL SEXING DENGAN GRADIEN DENSITAS PERCOLL MENGGUNAKAN PENGENCER CEP-2+10%KT

Fatahillah¹⁾, Trinil Susilawati²⁾ dan Nurul Isnaini²⁾

- 1). Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- 2). Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama sentrifugasi terhadap kualitas dan proporsi spermatozoa X-Y sapi limousin hasil sexing dengan gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2 + 10% kuning telur. Metode penelitian yang digunakan adalah metode percobaan. Dalam penelitian ini percobaan dilakukan dengan 2 perlakuan terdiri dari lama sentrifugasi 5 menit dan 7 menit menggunakan kecepatan yang sama yaitu 2250 rpm (850 G). Hasil penelitian menunjukkan perlakuan sentrifugasi 5 menit memiliki kualitas yang lebih baik dari 7 menit meliputi konsentrasi, viabilitas dan total spermatozoa motil, sedangkan abnormalitas dan motilitas lebih baik sentrifugasi 7 menit dari pada 5 menit. Proporsi spermatozoa X pada perlakuan sentrifugasi 5 dan 7 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) yaitu 78,6% dan 76,5%.

Kata kunci : Sentrifugasi, Sexing Gradien Densitas Percoll, Kualitas Spermatozoa, Proporsi Spermatozoa, CEP-2+10%KT

PENDAHULUAN

Kesadaran masyarakat akan pentingnya mengkonsumsi protein hewani ditambah dengan pertambahan jumlah penduduk yang semakin tinggi menyebabkan permintaan pasokan protein hewani yang berkualitas semakin meningkat dari tahun ke tahun. Salah satu upaya untuk meningkatkan produksi dan kualitas produk pangan yang mengandung protein hewani adalah dengan meningkatkan mutu genetik ternak sapi melalui penerapan bioteknologi reproduksi. Secara umum bioteknologi reproduksi merupakan teknologi unggulan dalam meningkatkan produktifitas terutama dalam pemanfaatan rekayasa bioteknologi reproduksi (Diyanto, 2008). Salah satu contoh bioteknologi yang saat ini sudah dilakukan adalah IB (inseminasi buatan), akan tetapi jenis kelamin anak hasil IB masih belum bisa dipastikan, sehingga perlu dikembangkan menggunakan metode *sexing*. Keberhasilan *sexing* spermatozoa X dan Y dapat menghasilkan pedet dengan jenis kelamin yang diharapkan. *Sexing* spermatozoa X dan Y sudah dilakukan dengan berbagai metode yaitu : Kolom albumin, *velocity sedimentation*, sephadex kolom, sentrifugasi gradien densitas percoll, pemisahan *elektroforesis*, *isoelectric focusing*, *H-Y antigen*, *flow shorting* dan *laminar flow fractionation* (Johnson and Welch, 1999).

Garner and Hafez (2008) menjelaskan bahwa metode *sexing* yang saat ini sering dilakukan untuk *sexing* spermatozoa X dan Y adalah gradien densitas percoll dengan dasar perbedaan berat jenis spermatozoa X dan Y yang dipisah dengan cara sentrifugasi. Pengencer diperlukan pada proses *sexing* untuk mencegah kerusakan membran spermatozoa setelah sentrifugasi sehingga kualitas spermatozoa tetap terjaga. Delgado (2009) mengungkapkan bahwa Cauda epididymis plasma (CEP-2) adalah pengencer alternatif

baru. Cauda epididymis plasma (CEP-2) merupakan pengencer semen segar yang dikembangkan berdasarkan pada analisis cairan cauda epididymis. Pengencer ini dapat mempertahankan motilitas dan integritas membran sperma yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan pengencer tris. *Sexing* dengan sentrifugasi gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2+10%KT diharapkan dapat menghasilkan kualitas semen *sexing* yang optimal.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai Agustus 2012 di Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah semen segar yang berasal dari 3 sapi Limousin yang dipelihara di BBIB Singosari : 1) Andi, kode 80545, bobot badan 870 kg, umur 7 tahun. 2) Arion, kode 80550, bobot badan 850 kg, umur 7 tahun. 3) Dodi, kode 80893, bobot badan 800 kg, umur 4 tahun. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas masa $\geq 2+$, motilitas individu $\geq 70\%$ dan penampungan dilakukan dua kali seminggu.

Metode yang digunakan adalah metode percobaan. Percobaan pada penelitian ini dilakukan dengan 2 perlakuan terdiri dari lama sentrifugasi 5 menit dan 7 menit menggunakan kecepatan yang sama yaitu 2250 rpm (850 G) dilanjutkan pencucian dengan sentrifugasi menggunakan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit.

Variabel yang diamati adalah uji kualitas semen segar dan semen perlakuan meliputi pemeriksaan makroskopis (warna, pH dan volume) dan pemeriksaan mikroskopis (konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas dan total spermatozoa motil), pengamatan morfometri spermatozoa dan penentuan spermatozoa X dan Y.

Langkah pertama dalam tahapan penelitian ini adalah membuat pengencer terlebih dahulu, pengencer semen yang digunakan adalah CEP-2 yang telah dikembangkan oleh Verbeckmous *et al* (2004). Komposisi kimia pengencer CEP2 + Kuning Telur 10% adalah sebagai berikut: NaCl 15 mmol/l, KCl 7 mmol/l, CaCl₂ · (H₂O)₂ 3 mmol/l, MgCl₂(H₂O)₆ 4 mmol/l, NaHCO₃ 11,9 mmol/l, NaH₂PO₄ 8 mmol/l, KH₂PO₄ 20 mmol/l, Fruktosa 55 mmol/l, Sorbitol 1 g/l, BSA 2 g/l, Tris 133,7 mmol/l, gentamicin 0,05 g/l, asam sitrat 42 mmol/l. Setelah pembuatan pengencer CEP-2 selesai maka dilanjutkan dengan penambahan kuning telur dengan konsentrasi 10% pada pengencer CEP-2.

Proses selanjutnya adalah uji makroskopis dan mikroskopis pada semen segar yang datang untuk mengetahui kualitas semen segar kemudian baru dilakukan proses sexing dengan 2 perlakuan yang berbeda. Penyusunan gradien pada proses sexing menggunakan metode gradien densitas percoll. Gradien densitas yang digunakan adalah 10 Gradien (20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %). Konsentrasi tersebut diperoleh dari medium percoll dengan penambahan pengencer CEP-2 + kuning telur 10 % dengan volume tiap gradien yang disusun 0,5 ml. Semen yang telah memenuhi syarat dimasukkan tabung yang telah berisi gradien densitas percoll sekitar 1 ml, kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm selama 5 dan 7 menit. Diambil dan dipisahkan lapisan atas 1 ml dan lapisan bawah 1 ml kemudian masing-masing dimasukkan dalam tabung yang telah berisi “pengencer” sebanyak 3 ml, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit untuk pencucian. Supernatan dibuang dan disisakan 2 ml cairan yang banyak mengandung spermatozoa (Susilawati, 2011).

Setelah proses sexing selesai dilakukan uji mikroskopis pada kualitas

semen dimasing-masing preparat dengan perlakuan yang berbeda, kemudian juga dilakukan pengamatan morfometri yaitu menghitung panjang dan lebar spermatozoa yang juga berfungsi untuk menentukan spermatozoa X dan Y pada tiap preparat (Arifiantini, 2006).

Data hasil penelitian dicatat dan ditabulasi menggunakan program excel kemudian dilakukan analisis dengan uji T berpasangan untuk membedakan dua macam perlakuan. Jika hasil data yang didapatkan dalam bentuk nilai persentase maka dilakukan transformasi dengan ketentuan apabila ditemukan nilai 0-30% atau 70-100% maka cara transformasinya adalah transformasi akar kuadrat menggunakan rumus $\sqrt{(n + 0,5)}$ dan jika nilai yang ditemukan adalah 0-100% maka transformasi yang dilakukan menggunakan tabel arcsin, akan tetapi jika nilai yang ditemukan antara 30-70% maka tidak perlu dilakukan transformasi (Sastrosupadi, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Semen segar sebelum digunakan untuk penelitian terlebih dahulu dilakukan pengujian untuk mengetahui kualitas semen segar. Semen diuji secara makroskopis dan mikroskopis, setelah itu dilakukan perhitungan proporsi spermatozoa X dan Y. berikut adalah hasil pemeriksaan semen segar :

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Semen Segar

Parameter	Nilai \pm SD
Volume	5,00 \pm 1,15
Warna	Putih kekuningan
pH	7 \pm 0,00
Motilitas masa (%)	2+
Motilitas Individu (%)	70,00 \pm 0,00
Viabilitas (%)	92,12 \pm 1,42
Abnormalitas (%)	5,54 \pm 3,59
Konsentrasi (10^6 /ml)	1437,50 \pm 450,31
Persentase spermatozoa X (%)	54,60 \pm 10,76
Persentase spermatozoa Y (%)	45,40 \pm 10,76

Berdasarkan data pada Tabel 1, hasil pemeriksaan makroskopis dapat diketahui warna semen segar adalah putih kekuningan dan memiliki pH 7. Warna dan pH semen segar pada penelitian ini sesuai dengan pendapat Ax *et al.* (2008) yang menyatakan bahwa semen sapi normal memiliki warna putih kekuningan dan pH 6,4-7,8. Garner and Hafez (2008) menambahkan bahwa semen normal memiliki pH 7, sehingga semen segar pada penelitian ini yang memiliki pH 7 dapat dikatakan normal.

Hasil pemeriksaan untuk motilitas masa semen segar penelitian ini adalah ++ dengan motilitas individu 70,00 \pm 0,00% yang menunjukkan bahwa spermatozoa memiliki pergerakan masa dan motilitas progresif yang baik, semakin banyak spermatozoa yang bergerak progresif maka

semakin baik pula kualitas spermatozoa. Hasil penelitian Rahmah (2007) menunjukkan motilitas massa semen segar sebesar ++ dan motilitas individu 71,75%. Standar pembuatan semen cair yang harus dipenuhi adalah motilitas massa ++ sampai dengan +++, motilitas individu \geq 70%, dengan demikian dapat dinyatakan bahwa kualitas semen segar yang digunakan pada penelitian ini sudah memenuhi standar.

Persentase viabilitas semen segar pada penelitian ini mencapai 92,12 \pm 1,42%. Nilai viabilitas tersebut dapat dikatakan baik jika dibandingkan dengan hasil penelitian Arifiantini dkk. (2005) yang menunjukkan angka viabilitas semen segar sapi sebesar 89,32%. Hasil pengamatan abnormalitas semen segar pada penelitian ini diperoleh 5,54 \pm 3,59%, hal ini tergolong rendah dan dapat dikatakan kualitas spermatozoa semen segar ini adalah baik, karena semakin rendah proporsi spermatozoa abnormal maka semakin baik kualitas spermatozoa tersebut, semen yang memiliki abnormalitas tinggi akan berpengaruh terhadap fertilitas. Abnormalitas diatas 20% akan menunjukkan kualitas semen yang rendah dan tidak layak untuk proses lebih lanjut (Hafez and Hafez, 2008). Jumlah konsentrasi spermatozoa semen segar pada penelitian ini didapat 1437,50 \pm 450,31 10^6 /ml, nilai konsentrasi tersebut dapat dikatakan normal karena standar konsentrasi spermatozoa sapi adalah 800×10^6 /ml – 2000×10^6 /ml (Garner and Hafez, 2008).

Data pada Tabel 1 menunjukkan proporsi Spermatozoa X semen segar sebesar 54,6 \pm 10,76% dan Spermatozoa Y 45,4 \pm 10,76%. Jumlah tersebut didapat dari pengukuran kepala spermatozoa sebagai dasar penentuan spermatozoa X dan Y. Pengukuran panjang dan lebar spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikrometer. Langkah pertama yang dilakukan adalah kalibrasi antara mikrometer okuler dengan mikrometer objektif untuk memperoleh

ukuran yang sebenarnya. Hasil kalibrasi diperoleh angka 2,56 sehingga hasil perhitungan oleh mikrometer okuler dikalikan angka kalibrasi 2,56 untuk memperoleh ukuran sebenarnya dengan satuan mikro (μm). Penentuan spermatozoa X dan Y dilakukan melalui perhitungan rata-rata ukuran kepala spermatozoa semen segar dengan mikrometer okuler yaitu panjang \times lebar kepala spermatozoa, kemudian dicari rata-ratanya. Jika ukuran spermatozoa yaitu panjang \times lebar \geq rata-rata maka diduga sebagai spermatozoa X dan jika $<$ dari rata-rata maka diduga sebagai spermatozoa Y. Spermatozoa yang memiliki ukuran kepala dibawah rata-rata adalah spermatozoa Y dan yang memiliki ukuran kepala sama atau lebih besar dari rata-rata adalah spermatozoa X karena spermatozoa X mengandung kromatin lebih besar (Garner and Hafez, 2008). Susilawati (2003) menambahkan bahwa spermatozoa Y biasanya lebih kecil kepalanya, lebih ringan dan lebih pendek dibandingkan spermatozoa X. Data proporsi spermatozoa X dan Y semen segar kemudian dilakukan uji *Chi-Square* untuk mengetahui apakah sama dengan nilai harapan 50 : 50 atau 1 : 1. Hasil perhitungan uji *Chi-Square* diketahui bahwa terdapat penyimpangan tidak nyata ($P>0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa perbandingan spermatozoa X dan Y hasil pengamatan 54,6 : 45,4 sama dengan perbandingan 50 : 50 atau 1 : 1 sehingga dapat dikatakan sesuai dengan harapan.

Rata-rata Konsentrasi Spermatozoa Hasil Sexing

Data rata-rata konsentrasi spermatozoa hasil sexing dengan gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2+10%KT dengan lama sentrifugasi 5 dan 7 menit pada lapisan atas dan bawah dapat dilihat pada Tabel 2 berikut :

Tabel 2. Rata-Rata Konsentrasi Spermatozoa Hasil Sexing

Konsentrasi spermatozoa ($10^6/\text{ml}$)		
Perlakuan	Sentrifugasi 5 menit	Sentrifugasi 7 menit
Lapisan atas	727 \pm 224,85 ^a	553,70 \pm 245,06 ^a
Lapisan bawah	616,50 \pm 232,33 ^{ab}	675 \pm 207,59 ^b

Hasil pengamatan pada perlakuan 5 menit memperlihatkan bahwa rata-rata konsentrasi dilapisan atas memiliki jumlah lebih banyak dibandingkan lapisan bawah, sedangkan pada perlakuan 7 menit rata-rata konsentrasi spermatozoa lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan lapisan atas. Hal ini dimungkinkan karena pada saat proses sentrifugasi 5 menit pemisahan antara lapisan atas dan lapisan bawah kurang berjalan dengan sempurna, sehingga pada lapisan atas masih banyak tersisa populasi spermatozoa yang seharusnya turun ke lapisan bawah, sedangkan pada perlakuan 7 menit dimungkinkan mendapat waktu sentrifugasi yang cukup untuk pemisahan lapisan atas dan bawah sehingga populasi spermatozoa yang berada pada lapisan atas sudah turun ke lapisan bawah sesuai dengan ukuran spermatozoa. Spermatozoa yang ringan akan berada pada lapisan atas, sedangkan spermatozoa pada lapisan bawah memiliki ukuran yang lebih besar dan apabila dilakukan sentrifugasi cenderung lebih cepat membentuk endapan (Hafez, 2008). Adanya daya sentrifugal saat terjadinya sentrifugasi menyebabkan spermatozoa tertarik ke bawah dan membentuk endapan yang lebih banyak dibandingkan lapisan atas. Spermatozoa yang tertarik ke bawah akan berusaha menembus medium pemisah. Spermatozoa akan menempati posisi sesuai dengan densitas masing-masing dan sesuai dengan berat spermatozoa tersebut. Semakin lama

waktu sentrifugasi maka akan semakin banyak endapan yang terbentuk pada lapisan bawah. Susilawati (2001) berpendapat bahwa kecepatan dan lama sentrifugasi yang sesuai mempunyai kemampuan yang baik untuk memisahkan spermatozoa berdasarkan besarnya, yaitu spermatozoa yang kecil ke atas, sedangkan yang besar akan ke bawah.

Hasil perhitungan statistik diketahui bahwa konsentrasi spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 5 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah. Sedangkan konsentrasi spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 7 menit pada lapisan atas berbeda nyata ($P<0,05$) lebih rendah dibandingkan lapisan bawah.

Konsentrasi spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan atas pada perlakuan sentrifugasi 7 menit. Demikian juga hasil sexing pada lapisan bawah perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 7 menit.

Persentase Motilitas Spermatozoa Hasil Sexing

Data rata-rata motilitas spermatozoa hasil sexing dengan gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2+10%KT dengan lama sentrifugasi 5 dan 7 menit pada lapisan atas dan bawah dapat dilihat pada Tabel 3 berikut :

Tabel 3. Rata-Rata Persentase Motilitas Spermatozoa Hasil Sexing

Persentase motilitas spermatozoa (%)		
Perlakuan	Sentrifugasi 5 menit	Sentrifugasi 7 menit
Lapisan atas	57 ± 6,75 ^a	52,50 ± 6,24 ^a
Lapisan bawah	55 ± 5,77 ^a	61,25 ± 4,29 ^b

Motilitas spermatozoa hasil sexing secara keseluruhan memiliki angka lebih

rendah dari motilitas semen segar. Susilawati, Sumitro dan Susanto (1997) menambahkan bahwa penurunan motilitas ini dikarenakan pengaruh mekanis saat sentrifugasi dan juga disebabkan oleh medium spermatozoa dan suhu selama proses berlangsung sehingga terjadi penurunan motilitas spermatozoa. Hasil sexing dengan lama sentrifugasi 5 menit dapat diketahui bahwa lapisan atas yang diduga adalah spermatozoa Y memiliki motilitas lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan bawah yang diduga spermatozoa X. Hal ini dimungkinkan karena proses pemisahan lapisan atas dan bawah kurang berjalan dengan sempurna sehingga diduga masih ada spermatozoa X yang terdapat pada lapisan atas, disamping itu spermatozoa Y memiliki ukuran kepala lebih kecil sehingga lebih ringan dan cepat dalam bergerak. Perbedaan motilitas spermatozoa pada lapisan atas dan bawah juga bisa disebabkan karena adanya perbedaan jarak yang ditempuh spermatozoa. Jarak untuk menembus pada lapisan bawah lebih jauh sehingga motilitas lapisan bawah lebih sedikit dibanding lapisan atas. Selama menempuh jarak tersebut, spermatozoa membutuhkan energi yang semakin besar disetiap jarak yang ditempuh untuk menembus densitas yang paling tinggi, sedangkan tidak cukup tersedia energi bagi spermatozoa, kebutuhan energi yang tidak mencukupi dapat menurunkan motilitas (Saili, 1999). Hasil sexing dengan lama sentrifugasi 7 menit terlihat bahwa motilitas lapisan bawah yang lebih tinggi dibandingkan motilitas lapisan atas, hal ini berbanding terbalik dengan motilitas dari spermatozoa hasil sexing dengan sentrifugasi 5 menit. Salah satu faktor yang menyebabkan hal tersebut adalah waktu sentrifugasi yang terlalu lama. Waktu sentrifugasi yang lama dapat memungkinkan spermatozoa Y kehabisan energi sehingga motilitas lapisan atas lebih kecil dibanding lapisan bawah yang diduga memiliki

kandungan spermatozoa X yang mempunyai energi lebih banyak dibandingkan spermatozoa Y dan menyebabkan motilitas tetap stabil. Semakin lama waktu sentrifugasi seharusnya dapat menyebabkan penurunan motilitas pada spermatozoa.

Hasil perhitungan statistik diketahui bahwa motilitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 5 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan lapisan bawah. Sedangkan motilitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 7 menit pada lapisan atas berbeda nyata ($P < 0,05$) lebih rendah dibandingkan lapisan bawah.

Motilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan lapisan atas pada perlakuan sentrifugasi 7 menit. Sedangkan motilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah perlakuan sentrifugasi 5 menit berbeda nyata ($P < 0,05$) lebih rendah dibandingkan dengan lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 7 menit.

Persentase Viabilitas Spermatozoa Hasil Sexing

Pengamatan viabilitas dilakukan untuk mengetahui spermatozoa yang hidup dengan menggunakan pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna eosin-negrosin sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap warna eosin-negrosin, hal ini dikarenakan spermatozoa yang mati membrannya akan mudah ditembus sehingga dapat menyerap warna, sedangkan membran spermatozoa yang hidup masih normal sehingga susah dilintasi oleh eosin-negrosin (Tambing dkk., 2003).

Tabel 4. Rata-Rata Persentase Viabilitas Spermatozoa Hasil Sexing

Persentase viabilitas spermatozoa (%)		
Perlakuan	Sentrifugasi 5 menit	Sentrifugasi 7 menit
Lapisan atas	89,39 ± 4,20	88,75 ± 3,34
Lapisan bawah	88,16 ± 4,39	87,63 ± 3,05

Hasil pengamatan persentase viabilitas spermatozoa setelah sexing pada penelitian ini mengalami penurunan dari semen segar. Penurunan viabilitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh waktu pelaksanaan, temperatur lingkungan dan komponen-komponen yang terdapat pada medium. Pemisahan spermatozoa dengan metode sentrifugasi mengakibatkan kerusakan struktur membran spermatozoa. Kerusakan membran spermatozoa akan mengakibatkan terganggunya proses metabolisme sehingga spermatozoa melemah (Susilawati, 2003). Maxwell and Watson (1996) menyatakan bahwa kerusakan pada membran spermatozoa menyebabkan spermatozoa dapat menyerap warna pada saat uji warna eosin negrosin. Kerusakan membran akan berdampak pada spermatozoa yang awalnya mempunyai sifat permeabel, tidak mampu lagi menyeleksi keluar masuknya zat, sehingga pada saat dilakukan pewarnaan dengan eosin negrosin zat tersebut dapat masuk.

Data pada Tabel 4 menunjukkan hasil pengamatan viabilitas dengan lama sentrifugasi 5 dan 7 menit pada lapisan atas memiliki presentase lebih tinggi dibandingkan lapisan bawah. Data tersebut juga menjelaskan bahwa secara keseluruhan diketahui perlakuan dengan sentrifugasi 5 menit memiliki presentase viabilitas lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan sentrifugasi 7 menit. Semakin lama waktu

sentrifugasi maka presentase viabilitas akan semakin menurun. Hasil penelitian Susilawati (2003) sexing gradien densitas percoll menggunakan pengencer 4% FBS dalam TCM 199 dengan sentrifugasi selama 5 menit hanya menunjukkan presentase viabilitas $72,80 \pm 2,21$ %. Presentase viabilitas hasil penelitian Susilawati (2003) tersebut jika dibandingkan dengan viabilitas hasil penelitian ini masih lebih besar presentase viabilitas pada penelitian ini sehingga dapat dikatakan bahwa pengencer yang digunakan memiliki peran dalam meminimalisir penurunan viabilitas. Pengencer CEP-2+10%KT bisa disimpulkan lebih baik karena dapat menghasilkan presentase viabilitas lebih tinggi. Hal ini dimungkinkan karena pengencer CEP-2+10%KT dapat menyediakan lingkungan yang baik bagi spermatozoa dan melindungi membran. Pengencer CEP-2 memiliki kondisi yang sama seperti cauda epididimis plasma sapi yang mampu menyimpan spermatozoa dalam keadaan normal (Verbeckmoes dkk, 2004). Yamashiro, Wang, Yamashita, Kumamoto and Terada. (2006) menambahkan bahwa BSA dan kuning telur yang terdapat pada pengencer CEP-2 berperan melindungi dan mempertahankan permeabilitas dan integritas membran spermatozoa.

Hasil perhitungan statistik diketahui bahwa viabilitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 5 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah. Demikian juga viabilitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 7 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah.

Viabilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan atas pada perlakuan sentrifugasi 7 menit. Demikian juga viabilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata

($P>0,05$) dengan lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 7 menit.

Persentase Abnormalitas Spermatozoa Hasil Sexing

Abnormalitas morfologi spermatozoa dibedakan menjadi tiga yaitu primer, sekunder dan tersier. Abnormalitas primer adalah abnormalitas karena kegagalan spermatogenesis dan abnormalitas sekunder terjadi selama spermatozoa melalui epididimis. Kerusakan spermatozoa setelah ejakulasi atau penanganan yang salah pada saat inseminasi buatan disebut abnormalitas tersier (Hafez, 2008). Abnormalitas yang banyak ditemukan pada penelitian ini termasuk abnormalitas tersier, yaitu kepala terpisah dengan ekor, ekor patah dan melengkung (Sujoko dkk, 2009).

Tabel 5. Rata-Rata Persentase Abnormalitas Spermatozoa Hasil Sexing

Persentase abnormalitas spermatozoa (%)		
Perlakuan	Sentrifugasi 5 menit	Sentrifugasi 7 menit
Lapisan atas	$10,73 \pm 4,05$	$12,01 \pm 3,82$
Lapisan bawah	$10,33 \pm 3,22$	$8,60 \pm 3,99$

Persentase abnormal dalam penelitian ini diperoleh dari hasil perhitungan jumlah spermatozoa yang memiliki morfologi abnormal dibagi jumlah spermatozoa yang diamati dikalikan 100%. Berdasarkan data diatas dapat diketahui meingkatnya persentase abnormalitas spermatozoa setelah perlakuan sexing, hal ini diduga akibat sentrifugasi saat proses sexing. Putaran yang dihasilkan saat sentrifugasi mengakibatkan spermatozoa yang berada didalam mengalami benturan dan gesekan dengan dinding tabung maupun medium sehingga dapat merusak membran spermatozoa yang menyebabkan abnormalitas pada spermatozoa. Pernyataan tersebut diperjelas

oleh Sujoko dkk. (2009) yang menjelaskan bahwa sentrifugasi mengakibatkan gesekan antar spermatozoa atau antar spermatozoa dengan medium maupun dinding tabung sehingga menyebabkan kerusakan membran spermatozoa dan presentase abnormal meningkat. Presentase abnormalitas pada penelitian ini secara keseluruhan tergolong baik, karena dibawah 20% dan masih layak untuk diproses lebih lanjut sebagaimana pernyataan dari Hafez and Hafez (2008) bahwa semen yang memiliki abnormalitas diatas 20% tidak layak untuk dilakukan proses selanjutnya.

Data yang nampak pada Tabel 5 menjelaskan bahwa ada perbedaan presentase abnormalitas spermatozoa antara perlakuan sentrifugasi 5 menit dan 7 menit. Pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 7 menit memiliki presentase abnormalitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan sentrifugasi 5 menit, sedangkan pada lapisan bawah presentase abnormalitas spermatozoa dengan perlakuan sentrifugasi 5 menit lebih tinggi dibandingkan sentrifugasi 7 menit. Secara keseluruhan rata-rata presentase abnormalitas lebih tinggi pada perlakuan sentrifugasi 5 menit dibandingkan sentrifugasi 7 menit dan bisa dikatakan perlakuan sentrifugasi 7 menit lebih baik dalam meminimalisir peningkatan abnormalitas meski perbedaannya dengan perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak nyata. Seharusnya semakin lama sentrifugasi akan membuat presentase abnormalitas meningkat karena adanya gesekan saat sentrifugasi yang berjalan lebih lama dan menyebabkan abnormalitas pada spermatozoa. Pengamatan abnormalitas pada perlakuan sentrifugasi 7 menit dimungkinkan kurang adanya ketelitian saat penghitungan sel spermatozoa, dari 200 sel spermatozoa yang diamati pada tiap preparat kurang mewakili secara keseluruhan sehingga kemungkinan besar banyak sel abnormal yang belum terhitung.

Hal ini menjadikan abnormalitas spermatozoa perlakuan sentrifugasi 5 menit terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan abnormalitas spermatozoa perlakuan sentrifugasi 7 menit meskipun tidak terdapat pengaruh yang nyata dari kedua perlakuan.

Hasil perhitungan statistik diketahui bahwa abnormalitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 5 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah. Demikian juga abnormalitas spermatozoa hasil sexing sentrifugasi 7 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah.

Abnormalitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan atas pada perlakuan sentrifugasi 7 menit. Demikian juga abnormalitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 7 menit.

Total Spermatozoa Motil Hasil Sexing

Data rata-rata total spermatozoa motil hasil sexing dengan gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2+10%KT dengan lama sentrifugasi 5 dan 7 menit pada lapisan atas dan bawah dapat dilihat pada tabel dan Tabel 6 berikut :

Tabel 6. Rata-Rata Total Spermatozoa Motil Hasil Sexing

Total spermatozoa motil ($10^6/ml$)		
Perlakuan	Sentrifugasi 5 menit	Sentrifugasi 7 menit
Lapisan atas	210 ± 75,10 ^a	151 ± 84,50 ^b
Lapisan bawah	170 ± 64,10 ^a	210 ± 74,20 ^a

Total spermatozoa motil pada penelitian ini didapat dari hasil perhitungan volume semen × konsentrasi × presentase motilitas individu sebagaimana pendapat

Susilawati (2011), kemudian dilakukan perhitungan rata-rata dari 10 ulangan dan diperoleh data seperti yang terlihat pada Tabel 6. Hasil pengamatan pada perlakuan 5 menit memperlihatkan bahwa rata-rata total spermatozoa motil dilapisan atas memiliki jumlah lebih banyak dibandingkan lapisan bawah, sedangkan pada perlakuan 7 menit rata-rata total spermatozoa motil lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan lapisan atas. Hal ini dimungkinkan karena pada perlakuan sentrifugasi 5 menit spermatozoa Y yang diduga berada dilapisan atas memiliki kecepatan yang tinggi sehingga motilitasnya lebih tinggi dibandingkan lapisan bawah yang diduga spermatozoa X. Spermatozoa Y memiliki energi yang lebih sedikit dibandingkan spermatozoa X yang menyebabkan pada perlakuan sentrifugasi 7 menit motilitasnya menurun karena waktu sentrifugasi yang lama sehingga menyebabkan energi spermatozoa Y habis, sedangkan spermatozoa X motilitasnya tetap stabil karena masih memiliki energi untuk bergerak. Semakin lama waktu sentrifugasi seharusnya mengakibatkan total spermatozoa motil mengalami penurunan dan populasi spermatozoa juga semakin banyak turun ke lapisan bawah. Kualitas spermatozoa sangat ditentukan oleh jumlah total spermatozoa yang hidup dan mampu bergerak aktif ke depan (Hafez and Hafez, 2008). Rata-rata motilitas yang semakin tinggi akan lebih baik kualitasnya mengingat perjalanan jauh spermatozoa yang nantinya akan diarungi untuk membuahi ovum. Jumlah total spermatozoa motil pada penelitian ini cukup baik melihat standar IB menurut SNI untuk jumlah total motilitas spermatozoa adalah 40 juta spermatozoa/ml, sehingga semen pada penelitian ini layak untuk diproses lebih lanjut.

Hasil perhitungan statistik diketahui bahwa total spermatozoa motil hasil sexing sentrifugasi 5 menit pada lapisan atas tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan

bawah. Sedangkan total spermatozoa motil hasil sexing sentrifugasi 7 menit pada lapisan atas berbeda nyata ($P<0,05$) lebih rendah dibandingkan lapisan bawah.

Total spermatozoa motil hasil sexing pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 5 menit berbeda nyata ($P<0,05$) lebih tinggi dibandingkan lapisan atas pada perlakuan sentrifugasi 7 menit. Sedangkan total spermatozoa motil hasil sexing pada lapisan bawah perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 7 menit.

Rata-rata Proporsi Spermatozoa X Hasil Sexing

Data rata-rata proporsi spermatozoa X hasil sexing dengan gradien densitas percoll menggunakan pengencer CEP-2+10%KT dengan lama sentrifugasi 5 dan 7 menit pada lapisan atas dan bawah dapat dilihat pada Tabel 7 berikut :

Tabel 7. Rata-Rata Proporsi Spermatozoa X Hasil Sexing

Proporsi spermatozoa X (%)		
Perlakuan	Sentrifugasi 5 menit	Sentrifugasi 7 menit
Lapisan atas	20,90 ± 5,63 ^a	19,60 ± 8,04 ^a
Lapisan bawah	78,60 ± 6,02 ^b	76,50 ± 4,28 ^b

Proporsi spermatozoa X pada penelitian ini didapat setelah sexing dengan lama waktu sentrifugasi 5 menit dan 7 menit. Pada proses sentrifugasi ini diperoleh dua lapisan materi yaitu lapisan atas dan lapisan bawah. Spermatozoa X diperoleh dari lapisan bawah karena spermatozoa X lebih cepat mengendap sebagai akibat ukuran dan berat yang lebih besar. Penentuan spermatozoa X dilakukan melalui uji morfometri dengan perhitungan panjang × lebar kepala hasilnya dirata-rata, jika ukurannya sama atau lebih

besar dari rata-rata maka mengindikasikan spermatozoa tersebut adalah spermatozoa X.

Sebagaimana terlihat pada Tabel 7, proporsi spermatozoa X pada lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 5 menit mencapai $78,6 \pm 6,02$ %, sedangkan pada perlakuan sentrifugasi 7 menit mencapai $76,5 \pm 4,28$ %. Proporsi spermatozoa X antara perlakuan sentrifugasi 5 dan 7 menit perbedaannya tidak begitu signifikan. Hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Susilawati dkk. (1997) yang menyatakan bahwa hasil sentrifugasi dengan kecepatan 2250 rpm dalam waktu 5 menit menghasilkan spermatozoa X 87 % pada lapisan bawah. Hal ini diduga karena banyaknya spermatozoa X yang masih tertinggal pada lapisan atas sehingga proporsi spermatozoa X dilapisan bawah lebih rendah dibanding hasil penelitian Susilawati dkk. (1997). Bruce, Dennis, Julian, Martin, Keith, James and Watson (1994) menjelaskan bahwa sentrifugasi berulang-ulang dengan laju yang semakin tinggi akan menghasilkan ekstrak sel yang terpilah menurut komponennya. Semakin kecil komponen seluler yang harus diendapkan semakin besar gaya sentrifugal yang dibutuhkan. Sedangkan gaya sentrifugal yang menyebabkan partikel dalam sampel mengendap dapat dibangkitkan melalui rotasi yang cepat.

Hasil perhitungan statistik diketahui bahwa proporsi spermatozoa X hasil sexing sentrifugasi 5 menit pada lapisan atas berbeda nyata ($P < 0,05$) lebih rendah dibandingkan lapisan bawah. Demikian juga proporsi spermatozoa X hasil sexing sentrifugasi 7 menit pada lapisan atas berbeda nyata ($P < 0,05$) lebih rendah dibandingkan lapisan bawah.

Proporsi spermatozoa X hasil sexing pada lapisan atas perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan lapisan atas pada perlakuan sentrifugasi 7

menit. Demikian juga proporsi spermatozoa X hasil sexing pada lapisan bawah perlakuan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan lapisan bawah pada perlakuan sentrifugasi 7 menit.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- Spermatozoa hasil sexing pada perlakuan sentrifugasi 5 menit memiliki kualitas lebih baik dibandingkan perlakuan sentrifugasi 7 menit.
- Proporsi spermatozoa X tertinggi terdapat pada perlakuan sentrifugasi 5 menit yaitu $78,6 \pm 6,02$ %.

Saran

- Sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan dengan variasi lama dan kecepatan sentrifugasi untuk mendapatkan kualitas dan proporsi spermatozoa X-Y yang lebih optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini, T.L., Yusuf dan Yanti, D. 2005. Kaji Banding Kualitas Semen Beku Sapi Frisien Holstein Menggunakan Pengencer dari Berbagai Balai Inseminasi Buatan di Indonesia. *Animal Production*. 7(3) : 168-176.
- , R.I., Wresdiyati, T. dan Retnani, E.F. 2006. Kaji Banding Morfometri Spermatozoa Sapi Bali (Bos sondaicus) Menggunakan Pewarna Williams, Eosin, Eosin Nigrosin dan Formol-Saline. *J.Sain Vet*. 24(1) : 65-70.

- Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varue, Hafez, B. and Bellin, M.E. 2008. *Semen Evaluation in Farm Animal Reproduction*. Hafez E.S.E. (Ed). 7th Edition. Lea Febiger : 365-375.
- Bruce, A., Dennis, B., Julian, L., Martin, R., Keith, R., James, D. and Watson. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Second Edition. Garland Publishing. Diterjemahkan oleh Alex, T.K.W. Gramedia. Jakarta.
- Delgado, P. A., Lester, T.D. and Rorie, R.W. 2009. Effect of a Low-Sodium, Choline-Based Diluent on Viability of Bovine Sperm Stored at Refrigerator Temperatures. *Arkansas Animal Science Department Report: 77-79*.
- Diwyanto, K. 2008. Pemanfaatan Sumber Daya Lokal dan Inovasi Teknologi Dalam Mendukung Pengembangan Sapi Potong di Indonesia. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. 1 (3) : 173-188.
- Garner, D.L and Hafez, E.S.E., 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In *Reproduction in Farm Animal*. Edited By Hafez, E. S. E., and B. Hafez 7th Edition. Blackwell Publishing. USA: 96-108.
- Hafez, E.S.E. 2008. *Anatomy of Male Reproduction Farm Animals*. Ed by ESE Hafez 7th edition. Blackwell Publishing. USA: 3-12
- , E.S.E. and Hafez, B. 2008. *X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa*. Ed by ESE Hafez 7th edition. Blackwell Publishing. USA: 390-394.
- Johnson, L.A. and Welch, G.R. 1999. Sex Preselection: High-Speed Flow Cytometric Sorting of X and Y Sperm for Maximum Efficiency. *Theriogenology*. 52 : 1323-1341.
- Maxwell W.M.C. and Watson. 1996. Recent Progress in The Preservation of Ram Semen. Stone and Evans (Editor). *Animal Reproduction Research And Practice* 13th. *International Congress on Animal Reproduction*. El Sevier. Sidney. Australia. 42 : 55-65.
- Rahmah, Z. 2007. Perubahan Integritas Membran Spermatozoa pada Proses Sexing dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Tesis. Program Pasca Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya*. Malang.
- Saili, T. 1999. Efektifitas Penggunaan Albumin Sebagai Medium Separasi Dalam Upaya Mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y Pada Sapi. *Tesis. Program Pasca Sarjana. Institute Pertanian Bogor*. Bogor.
- Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian*. Kanisius. Yogyakarta. 26-38.
- Sujoko, H., Setiadi, M.A. dan Boediono, A. 2009. Seleksi Spermatozoa Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner*. 10 (3) : 125-132.

- Susilawati, T., Sumitro, S.B., Sutanto, H. 1997. Upaya Pembekuan Semen Sapi Hasil Sexing Serta Penerapannya dalam Inseminasi Buatan Pada Sapi untuk Mendapatkan Pedet dengan Jenis Kelamin Sesuai Harapan. *Laporan Akhir Penelitian Riset Unggulan Terpadu*. Universitas Brawijaya. Malang: 17-21.
- , T. 2001. Perubahan Kontrol Sistem Transport Ion Kalsium Spermatozoa Sapi Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *JJIP*. 11 (2) :1-9.
- , T. 2003. Perubahan Fungsi Membran Spermatozoa Sapi Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin Menggunakan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Widya Agrika*. 11(1) : 27-33.
- , T. 2011. *Spermatologi*. UB Press. Malang.
- Tambing, S.N., Utama, I.K. dan Arifiantini, R.I. 2003. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Laktosa dalam Pengencer Tris terhadap Viabilitas Semen Cair Kambing Saanen. *JITV*. 8(2) : 84-90.
- Verberckmoes S., Van Soom, A., Dewulf, J. and de Kruif, A. 2004. Storage of Fresh Bovine Semen in Diluent Based on the Ionic Composition Of Cauda Epididymal Plasma. *J. Reproduction in domestic animal*. 39 : 1-7.
- Yamashiro, H., Wang, H., Yamashita, Y., Kumamoto, K. and Terada, T. 2006. Enhanced Freezability of Goat Spermatozoa Collected into Tubes Containing Extender Supplemented With Bovine Serum Albumin (BSA). *Journal of Reproduction and Development*. 52 (3) : 407-414.