

**PERBEDAAN KUALITAS SEMEN SAPI HASIL SEXING MENGGUNAKAN
SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS PERCOLL DENGAN LAMA WAKTU
YANG BERBEDA MEDIA PENGECER CEP-2 + 10% KUNING TELUR
PADA SUHU 5°C**

Iis Puspitasari¹, Trinil Susilawati², Nurul Isnaini²

¹Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

²Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145 Indonesia,

E-mail: iispuaspitasari81@gmail.com, E-mail: trinil_susilawati@yahoo.com

Abstract

This study aims to determine the differences quality of semen after sexing process using density percoll gradient on diluters CEP-2 supplement 10% egg yolk on 5°C with different centrifugation. The Observations quality of spermatozoa include motility, viability, abnormality, concentration and total motile spermatozoa. Percoll gradient was made by mixing percoll with diluters CEP-2 supplement 10% egg yolk, construct the gradient was 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% and 65%. The results showed 1). The percentage of motility, abnormality, viability of spermatozoa after sexing at 5°C on the top layer use 5 minutes centrifugation not significantly different ($P>0.05$) with 7 minutes centrifugation. Concentration and total motile sperm sexing results at 5°C using 5 minutes centrifugation significantly different ($P<0.05$) with 7 minutes centrifugation 2). The percentage of motily, abnormality, viability, concentration and total motile sperm after sexing at 5°C on the lower layer use 5 minutes centrifugation not significantly different ($P>0.05$) with 7 minutes centrifugation 3). The average percentage of motility, viability, concentration, and total motile sperm sexing result at 5°C using 5 minutes centrifugation higher than 7 minutes centrifugation and abnormality ware lower than 7 minutes centrifugation. The conclusion of the study aims was obtained sexing semen quality using a 5 minutes centrifuge better then result by using 7 minutes centrifugation. Suggestions from this study when production of semen sexing with percoll density gradient centrifugation using CEP-2 diluent medium supplement 10% egg yolk should use 5 minutes centrifugation.

PENDAHULUAN

Sexing merupakan salah satu contoh bioteknologi reproduksi. Pemanfaatan teknologi sexing atau pemisahan spermatozoa X dan Y merupakan pilihan tepat untuk mendukung peran Inseminasi Buatan (IB) dalam rangka meningkatkan efisiensi usaha peternakan. Keberhasilan sexing spermatozoa X dan Y adalah dapat menghasilkan pedet dengan jenis kelamin yang diharapkan (Sujoko, Setiadi, dan Boediono, 2009).

Pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradient densitas percoll menghasilkan spermatozoa pada bagian atas adalah Y dan bagian bawah X sebanyak 89% (Susilawati, 2005). Salah satu metode yang saat ini sering digunakan untuk sexing spermatozoa X dan Y adalah Sentifugasi Gradien Densitas Percoll (SGDP), yaitu dengan cara sentrifugasi atas dasar perbedaan berat jenis spermatozoa X dan Y. Spermatozoa X mengandung kromatin

lebih banyak di kepalanya, sehingga mengakibatkan ukuran spermatozoa X lebih besar (Garner and Hafez, 2008).

Metode pemisahan dengan cara Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll mempunyai peluang untuk dikembangkan, maka dalam penelitian ini digunakan perbedaan waktu sentrifugasi 5 menit dan 7 menit dengan mengamati penurunan kualitas yang terjadi mulai dari semen segar, setelah sexing dan pendinginan 5°C (*prefreezing*) menggunakan media pengencer CEP-2 dan 10% kuning telur.

Pendinginan dan pembekuan dapat menurunkan daya hidup dan fertilitas spermatozoa (Situmorang, 2002). Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas tinggi dibutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat thawing (Aboagla and Terada, 2004).

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 (Delgado, Lester, and Rorie, 2009). Pada penyimpanan 5°C terjadi kejutan dingin (*cold shock*) maka dibutuhkan pengencer yang mampu mempertahankan spermatozoa pada saat terjadinya kejutan dingin yaitu kuning telur

Kuning telur mengandung sumber nutrisi, lipoprotein dan lesitin, sehingga mampu menyediakan sumber energi, melindungi dan mempertahankan integritas membran spermatozoa (Susilawati, 2002).

Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang dirumuskan permasalahan, bagaimana perbedaan kualitas semen

hasil sexing menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll dengan lama waktu yang berbeda dengan media pengencer CEP-2 + 10% kuning telur pada suhu 5°C dengan lama sentrifugasi yang berbeda.

Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kualitas semen hasil sexing menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll dengan lama waktu yang berbeda dengan media pengencer CEP-2+10% kuning telur pada suhu 5°C yang meliputi : Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas, dan Total Spermatozoa Motil.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah metode percobaan laboratorium dengan lama sentrifugasi 5 menit dan 7 menit pada kecepatan 2250 rpm dan hasil sexing didinginkan pada suhu 5°C. Perlakuan ini dilakukan pengulangan sebanyak 10 kali.

Variabel Penelitian

Parameter yang diukur adalah kualitas spermatozoa secara makroskopis (volume, warna, bau, pH, kekentalan) dan secara mikroskopis pemeriksaan (motilitas massa dan individu, persentase spermatozoa hidup, persentase spermatozoa abnormal dan konsentrasi spermatozoa) (Ax *et al*, 2008)

Analisa Data

Analisa data hasil penelitian tentang motilitas, abnormalitas, konsentrasi spermatozoa dan total spermatozoa motil dilakukan dengan menggunakan uji t . prinsipnya bahwa dua macam perlakuan yang dilakukan dapat diketahui dari perbandingan t hitung (calculated) dan t daftar (Sastrosupadi, 2000).

Uji ini untuk mengetahui perbedaan rata-rata dua populasi/kelompok yang independen. Uji T independen ini memiliki asumsi/syarat yang mestinya dipenuhi yaitu : Datanya berdistribusi normal, Kedua kelompok data independen (bebas), Variabel yang dihubungkan berbentuk numeric dan kategorik (Sastrosupadi, 2000).

Secara perhitungan manual varian yang sama pada uji T independen, menggunakan formulasi sebagai berikut:

$$t = \frac{X_a - X_b}{S_p \sqrt{\left(\frac{1}{n_a}\right) + \left(\frac{1}{n_b}\right)}}$$

Dimana Sp :

$$Sp^2 = \frac{(Na - 1) Sa^2 + (Nb - 1) Sb^2}{Na + Nb - 2}$$

Keterangan:

Xa = rata-rata kelompok a

Xb = rata-rata kelompok b

Sp = Standar Deviasi gabungan

Sa = Standar deviasi kelompok a

Sb = Standar deviasi kelompok b

na = banyaknya sampel di kelompok a

nb = banyaknya sampel di kelompok b

(Sastrosupadi, 2000)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Rataan kualitas semen segar terdapat pada tabel 1. Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar menunjukkan pH 7 ± 0.00 dengan warna putih kekuningan. Menurut Garner dan Hafez (2008) rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4 – 7,8.

Tabel 1 rata-rata kualitas semen segar

Parameter	Rerata \pm SD
pH	7 ± 0.00
Warna	Putih kekuningan
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	70 ± 0.00
Viabilitas (%)	92.12 ± 1.42
Abnormalitas (%)	5.54 ± 3.59
Konsentrasi (10^6 /ml)	1437.50 ± 450.31

Hasil Tabel 1. memperlihatkan hasil pemeriksaan makroskopis semen segar, yaitu pH $7 \pm 0,00$ dan warna putih kekuningan. Derajat keasaman plasma semen menentukan kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin tinggi atau semakin rendah pH semen dari pH normal akan menyebabkan spermatozoa lebih cepat mati. Semen segar dengan pH 7 yang digunakan dalam penelitian ini dapat dikatakan normal. Menurut Garner dan Hafez (2008) rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4 - 7,8. pH dan warna semen segar dalam penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Sianturi, Situmorang, Triwulanningsih, dan Kusumaningrum (2004) dan Pratiwi, Pamungkas, Affandhy dan Hartati, (2006) yang menunjukkan bahwa pH semen segar adalah 7 dengan warna krem keputihan. Warna semen sapi dari ejakulasi yang normal adalah putih susu dan 10% saja yang berwarna krem (Susilawati dkk., 2003).

Salah satu ciri spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai

gerakan massa dan motilitas dengan gerakan progressif maju kedepan. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, maka gerakan massa akan semakin baik. Hasil pemeriksaan mikroskopis semen segar pada tabel 1. menunjukkan motilitas massa ++ dan motilitas individu $70 \pm 0,00\%$. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa rata-rata kualitas semen segar yang digunakan sebagai materi penelitian adalah baik, karena berada di atas persyaratan minimal semen yang digunakan untuk sexing. Hasil penelitian Rahmah (2007) memperlihatkan motilitas massa dan motilitas individu spermatozoa sapi dari semen segar adalah ++ dengan motilitas individu $71,75\%$.

Konsentrasi semen segar adalah $1437,50 \pm 450,31$ juta/ml dan nilai konsentrasi tersebut tergolong normal. Persentase motilitas dan konsentrasi semen segar yang digunakan sudah memenuhi persyaratan untuk proses lebih lanjut, karena persentase minimal motilitas dan konsentrasi yang dihasilkan harus 70% dan tidak kurang dari 500 juta spermatozoa/ml (Zenichiro, Herliantien dan Sarastina, 2002). Menurut Garner dan Hafez (2008) konsentrasi spermatozoa sapi adalah $800 \times 10^6 - 2000 \times 10^6$ /ml, dengan jumlah spermatozoa per ejakulasi $5 \times 10^9 - 15 \times 10^9$. Hasil yang tidak jauh berbeda juga terdapat pada penelitian Sianturi dkk, (2004) yang memperoleh konsentrasi sebesar 1351 ± 330 juta/ml. Perbedaan konsentrasi spermatozoa antar pejantan diduga disebabkan karena kualitas genetik pada masing-masing pejantan (Situmorang, 2002).

Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa dari semen segar adalah $92,12 \pm 1,42\%$. Nilai viabilitas tersebut masih termasuk dalam kisaran normal

dan tergolong tinggi. Hasil penelitian Pratiwi dkk. (2006) menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa semen segar adalah $93,5 \pm 2,1\%$. Hasil pengamatan uji mikroskopis menunjukkan abnormalitas spermatozoa semen segar adalah $5,28 \pm 3,46\%$. Nilai tersebut tergolong rendah karena kurang dari 20% . Semen yang memiliki proporsi abnormalitas yang tinggi akan berpengaruh terhadap fertilitas. Jika abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% hal ini menunjukkan kualitas semen yang rendah (Hafez dan Hafez, 2008) dan tidak layak untuk proses lebih lanjut. Hasil pengamatan abnormalitas dalam penelitian lebih rendah dari hasil penelitian Pamungkas, Affandhy, Wijono dan Hartati (2005) dimana nilai abnormalitas spermatozoa sapi dari semen segar adalah $7,47\%$. Kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen yang mempunyai kualitas baik, hal ini bertujuan agar spermatozoa lebih mampu bertahan selama proses pemisahan dengan metode sentrifugasi gradient densitas percoll.

Kualitas Spermatozoa Setelah Sexing Pada Suhu 5°C

Kualitas spermatozoa setelah sexing terdapat pada tabel 2. Hasil analisis statistik dengan uji t independen, menunjukkan motilitas spermatozoa sapi Limousin hasil sexing menggunakan pengencer CEP-2+10% Kuning Telur Pada Suhu 5°C pada lapisan atas dengan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan sentrifugasi 7 menit. Demikian juga motilitas pada lapisan bawah dengan sentrifugasi 5 menit tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan sentrifugasi 7 menit

Tabel 2. Kualitas spermatozoa setelah sexing pada suhu 5°C dengan lama sentrifugasi 5 menit dan 7 menit

Parameter	Sentrifugasi 5 Menit		Sentrifugasi 7 menit	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. atas	Lap. Bawah
Motilitas (%)	54,5±3,68	58,5±2,41	54±3,94	56,5±4,11
Viabilitas (%)	86,78±5,06	86,87±1,78	84,48±5,59	85,90±2,66
Abnormalitas (%)	11,47±7,61	14,39±9,18	27,41±31,90	12,85±11,02
Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	680,30±471,34	558,40±435,85	327,70±192,32 ^b	540,10±311,79
Total spermatozoa motil (10 ⁶ /ml)	189,99±139,15	165,84±132,05	89,52±52,83 ^b	152,47±86,52

Rata-rata motilitas spermatozoa setelah sexing (tabel 2) mengalami penurunan . Penurunan motilitas individu karena adanya sentrifugasi akibat proses sexing . Susilawati (2003) menyatakan bahwa sentrifugasi dapat mengakibatkan kerusakan membran yang berfungsi sebagai pelindung sel, apabila membran rusak dapat menyebabkan rusaknya organel-organel yang ada didalam sel seperti mitokondria yang merupakan tempat berlangsungnya respirasi sebagai penghasil energi dan apabila terjadi kerusakan maka dapat mengganggu metabolisme yang nantinya dapat mempengaruhi pergerakan spermatozoa.

Hasil penelitian viabilitas spermatozoa setelah sexing pada suhu 5°C (tabel 2) mengalami penurunan dari semen segar . penurunan ini disebabkan oleh terpisahnya spermatozoa dari seminal plasma, selain sebagai medium seminal plasma juga berfungsi sebagai penghasil energi. Apabila pasokan energi yang dibutuhkan spermatozoa kurang maka akan mengganggu kelangsungan hidup spermatozoa.

Sentrifugasi 5 menit memiliki rata- rata abnormalitas yang lebih rendah daripada sentrifugasi 7 menit (tabel 2). Hal ini disebabkan oleh gaya sentrifugal yang terjadi saat sentrifugasi yang menyebabkan dinding tabung dan medium atau dinding sel berbenturan, akibat benturan tersebut spermatozoa mengalami kerusakan. Susilawati (2000) bahwa spermatozoa setelah mengalami sentrifugasi tampak

adanya jarak antara kepala dan ekor juga tampak terkelupasnya membran kepala maupun ekor. Spermatozoa yang abnormal akan menurunkan tingkat motilitasnya, hal ini disebabkan spermatozoa yang abnormal tidak dapat bergerak progresif. Kusumawati (2006) Peningkatan abnormalitas spermatozoa selama proses pendinginan disebabkan oleh adanya perubahan tekanan osmose karena adanya pengeluaran ion-ion, dehidrasi yang hebat menyebabkan sel mengkerut dan akan merusak membran sel.

Konsentrasi merupakan jumlah spermatozoa yang terdapat dalam 1 ml semen. Penilaian konsentrasi spermatozoa per ml semen penting untuk dilakukan , karena hal ini digunakan sebagai criteria penentu kualitas semen (Susilawati, 2011). Persentase konsentrasi spermatozoa pada lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan lapisan atas pada sentrifugasi 5 menit (tabel 2). Hal ini disebabkan karena gaya sentrifugal yang terjadi saat sentrifugasi menyebabkan spermatozoa tertarik kebawah, sehingga pada lapisan bawah terdapat endapan lebih banyak dibanding lapisan atas. Kecepatan didalam sentrifugasi memegang peranan penting , semakin tinggi kecepatan maka gaya sentrifugal yang ditimbulkan akan semakin besar, sehingga mengakibatkan jumlah spermatozoa yang turun semakin banyak . Hal ini didukung (Susilawati, 2011) kecepatan dan lama sentrifugasi yang sesuai menyebabkan kemampuan yang baik untuk memisahkan spermatozoa berdasarkan besarnya, yaitu spermatozoa yang kecil ke atas dan yang besar akan kebawah.

Persentase Total Spermatozoa motil setelah sexing pada suhu 5°C pada sentrifugasi 5 menit lebih tinggi dari pada sentrifugasi 7 menit (tabel 2). Hal ini disebabkan Total spermatozoa motil sangat ditentukan oleh konsentrasi spermatozoa, apabila konsentrasinya tinggi maka total spermatozoa motil juga tinggi. Hafez and Hafez (2008) menyatakan bahwa daya fertilitas spermatozoa sangat ditentukan oleh jumlah total spermatozoa yang hidup dan mampu bergerak aktif kedepan.

KESIMPULAN

Kualitas semen hasil sexing menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll dengan lama waktu yang berbeda

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla, EM-E and Terada, T. 2004. *Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa*. Theriogenology 62:1160-1172.
- 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.
- Garner, D.L. and Hafez, E.S.E. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma. Reproduction in Farm Animals*. 7nd Ed by E.S.E Hafez & B.Hafez. Kiawah Island, South Caroline. USA: 96-125.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. *X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa in Reproduction in Farm Animal*. 6th Edition. Lippincott Williams and Wikins. Philadelphia: 440-443.
- media pengencer CEP-2+10% kuning telur pada suhu 5°C menggunakan sentrifugasi 5 menit menghasilkan rata-rata persentase motilitas 54,5%, viabilitas 86,78%, konsentrasi 680,3 juta/ml, dan total spermatozoa motil 189,99 juta/ml lebih tinggi dibandingkan dengan sentrifugasi 7 menit yang menghasilkan rata-rata motilitas 54%, viabilitas 84,48%, konsentrasi 327,7 juta/ml, total spermatozoa motil 89,52 juta/ml, sedangkan abnormalitas pada sentrifugasi 5 menit nilainya yaitu 11,47% artinya lebih rendah jika dibandingkan dengan abnormalitas pada sentrifugasi 7 menit yaitu 27,41% .
- Kusumawati, E. 2006. *Pengaruh Pengencer dan Proses Pembekuan yang berbeda terhadap kualitas semen sexing pada sapi limousine*. Thesis. Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang
- Pratiwi, W.C., Pamungkas, D. Affandhy, L. dan Hartati. 2006. *Evaluasi Kualitas Spermatozoa Hasil Sexing pada Kemasan Straw Dingin yang Disimpan pada Suhu 5°C Selama 7 Hari*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006 : 143-150.
- Rahma, Z. 2007. *Perubahan Integritas Membran Spermatozoa pada Proses Sexing dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll*. Thesis. Program Pasca Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang
- Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Peternakan*. Kanisius. Yogyakarta.

- Sianturi, R.G., Situmorang, P., Triwulanningsih, E., dan Kusumaningrum, D.A. 2007. *Pengaruh Penambahan Glutathione dan Kolesterol pada Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Metode Kolom Albumin Telur*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner: 207-213.
- Situmorang, P. 2002. *The effect of cholesterol on the viability and fertility of bull spermatozoa*. JITV. 7 (4): 251-258.
- 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. 2000. *Analisa Membran Spermatozoa Hasil Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin*. Disertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Susilawati, T. 2002. *Sexing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Gradien Putih Telur*. Jurnal Widya Agrika. 10 (2): 97-105.
- Susilawati, T. 2003. *Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur*. Protein, Jurnal Ilmiah dan Ilmu Peternakan dan Perikanan, Juli-Desember. 20: 1431-1438.
- Susilawati, T. 2005. *Tingkat Keberhasilan Kebuntingan dan Ketepatan Jenis Kelain hasil Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku Sexing pada Sapi Peranakan Ongole*. Journal of Animal Production : 3,161-167.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Varbeckmoes S., Van Soom, A., Dewulf, J., and de Kruif, A. 2004. *Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen*. Theriogenology. 42-63.