

Uji kualitas sperma sexing sapi Friesian Holstein (FH) pasca thawing

Evaluation of quality sexing sperm Friesian Holstein (FH) post thawing

RIZMA DERA ANGGAINI PUTRI^{1,✉}, MUHAMMAD GUNAWAN^{2,✉}, EKAYANTI MULYAWATI KAIIN²

¹ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Jl. Ir. Sutami36A Surakarta 57126, Jawa Tengah. Tel./Fax. +62-271-663375. ✉email: rizmadera754@gmail.com

² Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. ✉email: muhammadgunawan@ymail.com

Manuskrip diterima: 16 Mei 2015. Revisi disetujui: 11 September 2015.

Abstrak. Putri RDA, Gunawan M, Kaiin EM. 2015. Uji kualitas sperma sexing sapi Friesian Holstein (FH) pasca thawing. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 2057-2061*. Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan dalam inseminasi Buatan (IB) adalah kualitas sperma yang akan diinseminasikan. Penyimpanan sperma dalam bentuk beku dilakukan untuk mempertahankan usia sperma. Pembekuan sperma dapat menimbulkan dampak pada kualitas sperma yang dibekukan. Kualitas sperma yang masih segar tentu saja akan berbeda dengan kualitas sperma pasca thawing. Tujuan penelitian untuk mengetahui kualitas sperma sexing sapi FH (Friesian Holstein) pasca thawing. Parameter kualitas yang diujikan yaitu motilitas sperma, membran plasma utuh (MPU), viabilitas, abnormalitas serta morfometrinya. Untuk motilitas sperma dihitung dengan menggunakan SpermVision, abnormalitas dan morfometri menggunakan pewarna Eosin-Negrosin, viabilitas menggunakan Eosin-Negrosin dan pewarna Hoechst, serta untuk pengamatan parameter MPU menggunakan 3 larutan Hipo Osmotic Swelling (HOS) Test yang berbeda. Hasil pengujian didapatkan motilitas sperma tertinggi yaitu Sperma X (52,39%), Nilai MPU tertinggi yaitu Sperma X (80,95%), Viabilitas tertinggi yaitu Sperma Y (80,16%), Abnormalitas terendah yaitu Sperma Non-sexing (5,4%). Berdasarkan parameter yang digunakan, kualitas sperma X lebih baik dibandingkan dengan kualitas Sperma Y dan Sperma non-sexing.

Kata kunci: Kualitas sperma, sapi FH, Friesian Holstein, sexing

Singkatan: Inseminasi Buatan (IB), FH (Friesian Holstein), Membran Plasma Utuh (MPU).

Abstract. Putri RDA, Gunawan M, Kaiin EM. 2015. Evaluation of quality sperm sexing Friesian Holstein (FH) post thawing. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1: 2057-2061*. Factors that influence the success in artificial insemination (AI) is the quality of the sperm to be inseminated. Frozen sperm storage was done to extend the life of sperm. However, there are any impacts caused by the freezing sperm process. The qualities of sperm are still fresh and will vary on the quality of sperm after thawing. The aim of this study is to determine the quality of FH bull sperm sexing after thawing. Parameters used are the percentage of motility, plasma membrane intact, viability, abnormalities, and morphometry. Sperm motility was analyzed by SpermVision. Abnormalities, morphometry, and viability were analyzed using Eosin-Negrosin and Hoechst dye, and parameters for plasma membrane intact using the three different formulations of Hypo Osmotic Swelling (HOS) Test. The results showed that the highest sperm motility was Sperm X (52.39%). The highest plasma membrane intact was Sperm X (80.95%) and the highest viability was Sperm Y (80.16%). Low sperm abnormality was observed in non-sexing (5.4%). The conclusion is the quality of sperm X better than Y sperm quality and non-sexing sperm.

Keywords: Sperm quality, FH bull, Friesian Holstein, sexing

PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) merupakan suatu cara untuk memasukkan spermatozoa dari ternak jantan ke dalam saluran alat kelamin betina dengan menggunakan metode dan alat khusus. Tujuan dari pelaksanaan IB ini yaitu untuk meningkatkan produksi dan produktivitas (pembibitan) ternak yang dimiliki, dengan memanfaatkan seekor hewan jantan unggul (pejantan) secara maksimal (Afiati et al. 2013).

IB ini akan lebih berdaya guna apabila anak yang dihasilkan berjenis kelamin sesuai keinginan dan tujuan pengembangan peternakan. Pembangunan bidang peternakan memprioritaskan anak berjenis kelamin jantan

dengan tujuan menghasilkan ternak potong atau penghasil daging. Anak yang berjenis kelamin betina ditujukan untuk peternakan sapi perah atau penghasil susu. Salah satu upaya untuk menghasilkan anak sesuai harapan adalah dengan melakukan pemisahan spermatozoa sebelum diinseminasikan (Sariadi et al. 2014).

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan Inseminasi Buatan adalah kualitas sperma yang akan diinjeksikan. Namun agar dapat tahan lebih lama, cairan sperma yang didapatkan terlebih dahulu dibekukan. Pembekuan ini berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa.

Spermatozoa beku memiliki keunggulan yaitu dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama, namun memiliki kelemahan yaitu kualitas spermatozoa dapat menurun

setelah spermatozoa diencerkan dikarenakan selama proses pembekuan, spermatozoa melewati berbagai suhu ekstrim yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa (Komariah et al. 2013).

Umur dan daya guna semen yang dibekukan akan bertahan lama karena pembekuan adalah menghentikan sementara kegiatan hidup dari sel (metabolisme sel) tanpa mematikan fungsi sel dimana proses hidup dapat terus berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Jadi, pada prinsipnya menggunakan faktor penurunan temperatur untuk mempertahankan daya hidup dan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Partodiharjo 1992).

Penentuan jenis kelamin anak sebelum dilahirkan lebih menguntungkan dari segi ekonomis, karena selain dapat menekan biaya pemeliharaan juga dapat menunjang program *breeding* dalam pemilihan bibit unggul. Tujuan tersebut akan tercapai apabila dilakukan dengan cara menginseminasikan seekor betina birahi dengan spermatozoa yang sudah dipisahkan (spermatozoa berkromosom X atau spermatozoa berkromosom Y) (Hafez 2004).

Salah satu sapi perah yang umum dternakkan di Indonesia adalah sapi Friesian Holstein (FH). Berdasarkan hasil survei yang dilakukan PSPB Cibinong menunjukkan bahwa jenis sapi perah FH merupakan jenis sapi perah yang paling cocok dan menguntungkan untuk dibudidayakan di Indonesia (Nur 2013). Sapi FH merupakan tipe sapi perah dengan produksi susu yang tinggi mencapai 5982 kg per laktasi dengan kadar lemak susu rata-rata 3,7% dan memiliki kelebihan lain yaitu mampu beradaptasi dengan baik di daerah tropis maupun sub tropis (Syarif dan Sumoprastowo 1985).

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui kualitas sperma sexing sapi FH (Fries Holstein) pasca thawing dengan parameter kualitas yang diujikan yaitu motilitas sperma, membran plasma utuh (MPU), viabilitas, abnormalitas serta morfometrinya.

BAHAN DAN METODE

Alat dan bahan

Alat yang digunakan yaitu mikroskop dengan aplikasi Sperm vision dan *AxioVision Rel 4. 3*. Bahan yang digunakan yaitu semen beku dalam straw medium dengan kode LIPI Arjuna FH 0688 0403-8 16. 4. 2014 non-sexing, LIPI Arjuna FH X 0688 0503-9 21. 05. 2014, LIPI Arjuna FH Y 0688 0503-9 21. 05. 2014. Evaluasi abnormalitas spermatozoa menggunakan pewarna Eosin-Negrosin, evaluasi viabilitas menggunakan Eosin-Negrosin dan pewarna Hoechst, serta untuk evaluasi membran plasma utuh (MPU) menggunakan 3 larutan Hypo Osmotic Swelling (HOS) Test yang berbeda yaitu Larutan HOS-Test 1 (0,0124 gr Natrium Sitrat; 0,226 gr Fruktosa dan 20 ml Aquabidest); Larutan HOS-Test 2 (0, 2702 gr Fruktosa; 0,147 gr Natrium Sitrat dan 20 ml Aquabidest); Larutan HOS-Test 3 (0,0358 gr NaCl dan 20 ml Aquabidest).

Cara kerja

Motilitas

Masing-masing 10 μ L sperma diambil, dan diletakkan pada kedua ujung gelas benda, lalu ditutup dengan gelas penutup. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan software Spermvision (Minitube, German).

Abnormalitas, viabilitas, morfometri dan MPU

Masing-masing uji dibuat preparat apusan sesuai dengan pewarnaannya masing-masing. Pengamatan abnormalitas dilakukan dengan pengamatan bentuk morfologi spermatozoa normal dan spermatozoa abnormal di bawah mikroskop perbesaran lensa 20 kali. Pengamatan viabilitas menggunakan dua jenis pewarnaan, Eosin-Negrosin dan Hoechst, masing-masing dihitung persentasi sel spermatozoa hidup dan mati. Pengukuran morfometri spermatozoa meliputi panjang, lebar dan luas dengan aplikasi *AxioVision Rel 4. 3*. Pengamatan MPU menggunakan 3 jenis larutan HOS Test. Sampel sperma diambil sebanyak 20 μ L dan dicampurkan dengan masing-masing larutan HOS Test, sehingga didapatkan tiga larutan kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C. Larutan HOS Test 1 dan 2 diinkubasi selama 30 menit. Untuk larutan HOS Test yang ketiga diinkubasi selama 20 menit. Setelah diinkubasi, sampel diambil sebanyak 20 μ L dari masing-masing larutan dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 20 kali. Spermatozoa yang masih memiliki membran plasma utuh ditandai dengan bagian ekor melingkar dan spermatozoa dengan membran plasma yang telah rusak ditandai dengan ekor lurus.

Analisis data

Analisis data primer nilai *recovery rate* dihitung berdasarkan rumus perhitungan *recovery rate*:

$$RR = \frac{\text{Motilitas spermatozoa setelah thawing}}{\text{Motilitas Spermatozoa Segar}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas sperma

Perhitungan motilitas menggunakan software *Sperm vision*, dengan 4 parameter pengamatan. Untuk hasil motilitas dapat dilihat pada Tabel 1. Pada tabel tersebut dapat dilihat yang memiliki persentase motilitas tertinggi yaitu pada sperma X sebesar 52,37%, lalu diikuti sperma Y sebesar 48% dan yang memiliki persentase terendah yaitu 43,78%. Menurut Standar Nasional Indonesia yang dikeluarkan oleh Badan Standardisasi Nasional (BSN), Pemeriksaan semen beku segera sesudah dicairkan kembali (*post thawing*) pada suhu 37⁰C selama 30 detik harus menunjukkan spermatozoa hidup dan bergerak maju (*motilspermatozoa*) minimal 40 (empat puluh) persen (ICS 65. 020. 30). Ketiga sperma tersebut telah melampaui standar yang telah ditentukan.

Membran plasma utuh (MPU)

Sperma X memiliki persentase tertinggi untuk rata-rata dari membran plasma utuh (MPU) dari tiga jenis larutan HOS-Test yang berbeda (Tabel 2). Integritas membran spermatozoa yang masih baik menunjukkan bahwa fosfolipid dapat bertahan dan menjaga dengan baik terhadap benturan antara tabung dan medium saat seksing. Fosfolipid berfungsi untuk memelihara integritas membran dan membentuk permukaan yang dinamis antar sel sebagai perlindungan terhadap kondisi lingkungan. Proses sexing dengan sentrifugasi dapat menyebabkan lepas sebagian fosfolipid membran spermatozoa akibat dari pengaruh mekanik yaitu adanya gaya sentrifugal. Lepasnya sebagian fosfolipid membran dapat menyebabkan integritas membran terganggu sehingga berpengaruh pada viabilitas membran. Viabilitas dapat mempengaruhi motilitas dan integritas membran spermatozoa sehingga diduga spermatozoa yang motil tidak semua memiliki integritas membran yang baik (Diliyana et al. 2014).

Menurut Bag et al. (2002) pendinginan dan pembekuan dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma dan membran akrosom spermatozoa. Kerusakan membran ini pada gilirannya akan menurunkan viabilitas spermatozoa bahkan dapat menyebabkan kematian bagi spermatozoa.

Membran sperma berfungsi sebagai sarana transportasi energi dalam bentuk ATP yang dihasilkan oleh enzim didalam mitokondria melalui siklus kreb, dengan demikian dapat dinyatakan bahwa sperma yang motil progresif harus memiliki membran yang utuh. Di sisi lain sebenarnya kutuhan membran sangat penting artinya bagi sperma, karena jika membran sperma rusak tidak dapat diperbaiki lagi. Sperma yang membrannya rusak memiliki daya fertilisasi yang rendah, karena membran yang rusak selain tidak dapat diperbaiki, juga mengakibatkan cairan intraseluler keluar, sedangkan cairan ini mengandung molekul (unsur-unsur) yang sangat dibutuhkan saat bersatunya sperma dan sel telur dalam proses fertilisasi. (Jalius 2011).

Abnormalitas

Sperma X memiliki persentase abnormalitas paling tinggi bila dibandingkan dengan Sperma Y maupun Sperma non sexing (Tabel 3). Abnormalitas yang ditemukan dalam penelitian ini yaitu *detached head*, *pearshape*, *undeveloped*, *makrocephalon*, *mikrocephalon* dan *narrow*. Abnormalitas spermatozoa akan menyebabkan terjadinya gangguan terhadap proses pembuahan. Ada dua kemungkinan yang terjadi terhadap kemampuan fertilitas seekor pejantan dengan persentase abnormalitas spermatozoa yang tinggi, pertama spermatozoa tidak dapat mencapai tempat fertilisasi dan kedua spermatozoa tidak dapat membuahi sel telur atau mempertahankan perkembangan tahap awal embrio.

Morfometri

Pengukuran kepala spermatozoa dimaksudkan untuk mengetahui apakah spermatozoa tersebut normal atau abnormal. Morfologi spermatozoa abnormal merupakan salah satu indikator penting menurunnya fertilitas dari spermatozoa. Walaupun ukuran morfometrik kepala

spermatozoa tidak dipengaruhi secara nyata oleh frekuensi ejakulasi, namun ada kecenderungan ukuran panjang dan lebar kepala spermatozoa menurun seiring dengan meningkatnya frekuensi ejakulasi dan inkubasi.

Berdasarkan hasil perhitungan morfometri (Tabel 4), yang memiliki ukuran panjang kepala yang terpanjang yaitu Sperma Y dengan rata-rata sebesar 10,333 μm . Ukuran lebar kepala yang paling lebar yaitu sperma non-sexing dengan rata-rata sebesar 5,5 μm . Sedangkan yang memiliki ukuran kepala yang paling besarluasnya yaitu sperma X dengan rata-rata sebesar 45 μm^2 . Ukuran kepala sperma yang paling kecilnya yaitu Sperma Y. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pamungkas et al. (2005), yang menyatakan bahwa ukuran sperma Y lebih kecil. Spermatozoa berkromosom Y mempunyai kemampuan renang lebih cepat dibandingkan spermatozoa berkromosom X, spermatozoa Y memiliki densitas dan berat yang lebih rendah dibanding spermatozoa X (Sariadi et al. 2014).

Viabilitas

Hoechst merupakan pewarna inti sel yang terikat baik pada pasangan basa adenin-timin (AT) dan dapat menembus membran sel hidup, sedangkan PI hanya dapat menembus membran sel yang telah mati (Comet Assay Interest Group 2002). Spermatozoa yang mati akan terwarnai karena membran plasmanya telah rusak sehingga zat warna dapat masuk ke dalam sel melewati membran sedangkan spermatozoa yang hidup tidak dapat dilewati oleh zat warna.

Pada preparat yang menggunakan pewarnaan Eosin-Nigrosin spermatozoa yang hidup maka tidak akan terwarnai, sedangkan yang mati akan terwarnai. Sedangkan pada preparat yang menggunakan pewarnaan Hoechst yang hidup tidak akan berpendar pada filter tertentu pada mikroskop fluorescence, sehingga dalam pengamatannya membutuhkan jenis filter yang berbeda untuk membandingkan antara spermatozoa yang hidup dan yang telah mati.

Table 1. Nilai persentase motilitas spermatozoa pada berbagai jenis sperma sexing

Parameter	Sperma X	Sperma Y	Sperma non-sexing
Motility	52,37	48	43,78
Progressive motility	51,28	46,52	41,51
Local motility	1,09	1,76	2,26
Immotile	47,6	51,74	56,2

Table 3. Nilai abnormalitas spermatozoa pada berbagai jenis sperma sexing

Parameter	Sperma X	Sperma Y	Sperma non-sexing
Normal	101	100	140
Abnormal	17	7	8
% Abnormalitas	14,41	6,54	5,4

Tabel 2. Nilai Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa pada berbagai jenis HOST-Test

Parameter	Sperma X			Sperma Y			Sperma Non-Sexing		
	HT 1	HT 2	HT 3	HT 1	HT 2	HT 3	HT 1	HT 2	HT 3
Ekor melingkar	103	118	67	117	98	103	107	105	46
Ekor lurus	4	12	53	24	30	45	18	21	67
% MPU	96,26	90,77	55,83	82,98	76,56	69,59	85,6	83,33	40,7

Keterangan: HT = Host-Test

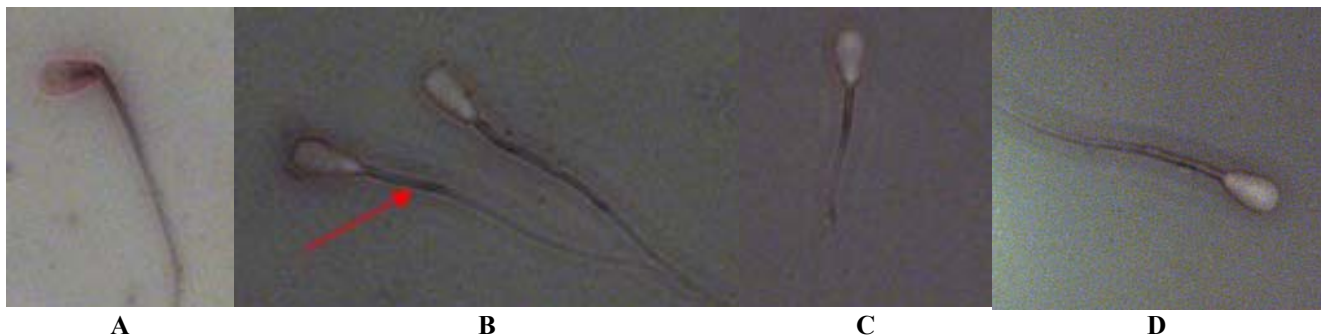
Tabel 4. Nilai rata-rata morfometri spermatozoa pada berbagai jenis sperma sexing

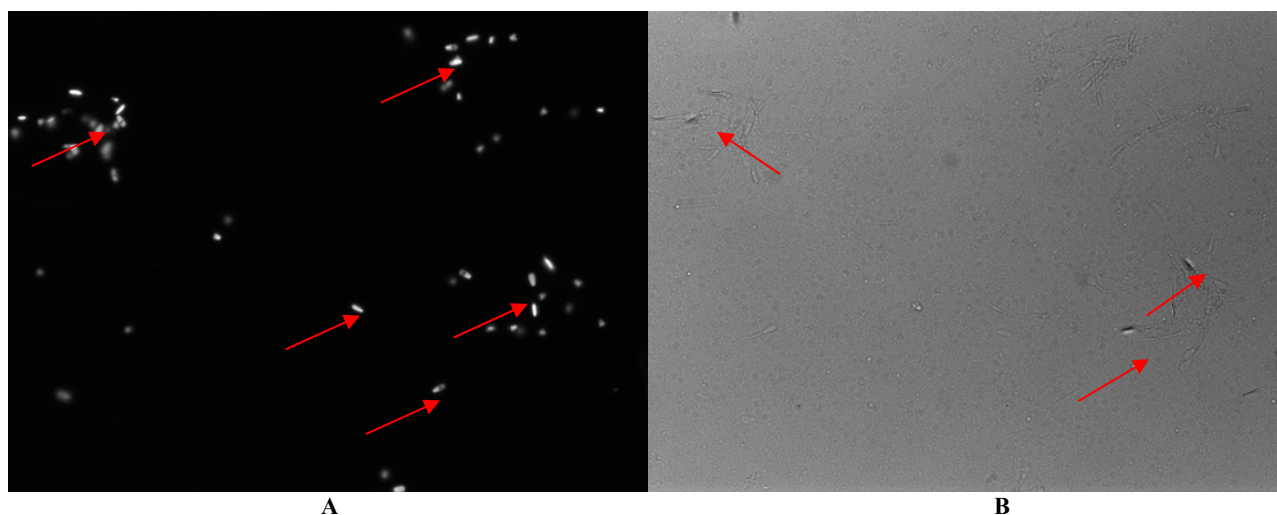
Sperma non-sexing			Sperma X			Sperma Y		
p(μm)	l(μm)	L(μm^2)	p(μm)	l(μm)	L(μm^2)	p(μm)	l(μm)	L(μm^2)
10	5,5	44	10	4,995	45	10,333	4,673	33,68

Keterangan: p= panjang kepala spermatozoa; l=lebar kepala spermatozoa; L= luas kepala spermatozoa.

Tabel 5. Nilai viabilitas spermatozoa pada berbagai jenis pewarnaan

Parameter	Sperma X			Sperma Y			Sperma non-sexing		
	Eosin-Negrosin	Hoechst+PBS	Hoechst+Na-sitrat	Eosin-Negrosin	Hoechst+PBS	Hoechst+Na-sitrat	Eosin-Negrosin	Hoechst+PBS	Hoechst+Na-sitrat
Hidup	111	138	112	94	111	102	83	108	74
Mati	60	53	56	35	27	15	37	36	29
% Viabilitas	64,91	72,25	66,6	72,87	80,43	87,17	69,17	75	71,84

**Gambar 1.** Contoh abnormalitas spermatozoa: (A) *Detached head*; (B) Pearshape; (C) Undeveloped; (D) Spermatozoa normal**Gambar 2.** Viabilitas Sperma dengan pewarnaan Eosin-Negrosin: (A) Sperma yang telah mati; (B) Sperma yang masih hidup



Gambar 3. Viabilitas Sperma dengan pewarnaan Hoechst: (A) Sperma yang telah mati; (B) Sperma yang masih hidup

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati F, Herdis, Said S. 2013. Pembibitan Ternak Dengan Inseminasi Buatan. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. 2002. Effect of freezing temperature, at which straw were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 72:175-183.
- Comet Assay Interest Group. 2002. Staining. <http://www.geocities.com/cometassay/stains.htm>. [19 Agu 2002].
- Diliyana YF, Susilawati T, Rahayu S. 2014. Keutuhan membran spermatozoa disekuensing sentrifugasi gradien densitas percoll berpengencer Andromed dan CEP-2 yang ditambahkan kuning telur. *Jurnal Veteriner* 15(1): 23-30.
- Hafez B, HafezESE. 2004. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Reproductive Health Center. IVF Andrology Laboratory. Kiawah Island, South Carolina, USA.
- Jalius. 2011. Hubungan mortalitas progresif dan keutuhan membran sperma dalam semen beku sapi Bali dengan keberhasilan inseminasi. *Agr Inak* 1 (1): 43-47.
- Komariah, Arifiantini I, Nugraha FW. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesian holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan* 37(3): 143-147.
- Nur A. 2013. Laporan Praktek Lapang: Ilmu Ternak Perah. Universita Hasanuddin, Makassar.
- Pamungkas D, Affandhy L, Wijono DB, Hartati. 2005. Aplikasi inseminasi semen hasil sexing pada sapi induk Peranakan Ongole. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veterineri, Bogor, 2005.
- Partodiharjo S. 1992. *Fisiologi Reproduksi Hewan*. Mutiara Sumber Widya-IPB, Bogor.
- Sariadi, Dasrul, Akmal, M. 2014. Rasio jenis kelamin kelahiran anak kambing Peranakan Ettawa (PE) hasil inseminasi buatan menggunakan spermatozoa *swim up*. *Agripet* 14 (2): 132-138.
- Syarief Z, Sumoprastowo. 1985. *Ternak Perah*. CV. Yasaguna, Jakarta