

Kualitas sperma sapi hasil *sexing* setelah kapasitasi secara *in vitro*

The quality of sexing-sorted bull sperm after *in vitro* capacitation

EKAYANTI MULYAWATI KAIIN[✉], MUHAMMAD GUNAWAN

Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jl. Raya Bogor Km 46 Cibinong 16911, Indonesia.
Tel.: +62-21-8754627, Fax. +62-21-8754588, ✉email: ekayantikaiin@yahoo.com.

Manuskrip diterima: 9 September 2017. Revisi disetujui: 31 Desember 2017.

Abstrak. Kaiin EM, Gunawan M. 2017. Kualitas sperma sapi hasil *sexing* setelah kapasitasi secara *in vitro*. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 3: 466-470. Sperma sapi hasil *sexing* (pemisahan jenis kelamin) dengan metode kolom *Bovine Serum Albumin* (BSA) 3 kolom 5-10%, diuji secara *in vitro* untuk melihat kualitas sperma secara mikroskopis setelah proses kapasitasi. Sperma sapi FH hasil *sexing* X (betina) dan Y (jantan) yang telah dibekukan, dicairkan kembali pada *waterbath* dengan suhu 37°C selama 30 detik. Kemudian dilakukan pengujian kualitas sperma, meliputi parameter motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Pengujian status kapasitasi sperma dilakukan dengan pewarnaan *triple staining*, dilakukan pada masing-masing sampel sebelum dan sesudah kapasitasi. Setelah itu, sperma X₁, X₂, dan Y dikapasitasi di dalam dua perlakuan medium TALP yang mengandung kafein 4 mM (I), serta kafein 4 mM dan heparin 10 µg/ml (II). Sebagai kontrol, digunakan sampel sperma yang tidak di-*sexing*. Penelitian dilakukan sebanyak 5 ulangan, masing-masing menggunakan *straw* sperma X, Y, atau tanpa *sexing*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas sperma X dan Y pada medium kapasitasi II (X₁=50,9%; X₂=48,6%, dan Y=51,5%) lebih tinggi secara nyata (p<0,05) dibandingkan dengan medium I (X₁=41,5%; X₂=43,9%, dan Y=41,3%). Hasil serupa juga diperoleh pada sperma yang tidak di-*sexing*. Viabilitas sperma X dan Y yang dikapasitasi pada medium II (X₁=66,9%; X₂=61,7%, dan Y=60,3%) juga menghasilkan persentase yang lebih tinggi dibandingkan dengan medium I (X₁=54,8%; X₂=50,6%, dan Y=54,9%). Nilai abnormalitas sperma X dan Y sesudah dikapasitasi pada kedua perlakuan medium, tidak berbeda nyata dibandingkan dengan sperma yang tidak di-*sexing*. Sebelum dikapasitasi, persentase sperma X dan Y yang mengalami reaksi akrosom lebih rendah (2,6% dan 0,5%), tetapi setelah dikapasitasi, jumlah sperma yang mengalami reaksi akrosom meningkat, baik pada perlakuan I maupun perlakuan II. Hasil ini menunjukkan bahwa *sexing* atau pemisahan sperma sapi X dan Y menggunakan kolom BSA, tidak menyebabkan terjadinya reaksi akrosom lebih awal sebelum proses kapasitasi.

Kata kunci: BSA, kapasitasi, reaksi akrosom, sapi FH, sperma *sexing*

Abstract. Kaiin EM, Gunawan M. 2017. The quality of sexing-sorted bull sperm after *in vitro* capacitation. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 3: 466-470. Sexing-sorted bull sperm separated with three column BSA (5-10%) was evaluated *in vitro* to determine the quality of sperm after capacitation. The frozen FH bull sexing-sorted X (female) and Y (male) sperms were re-thawed at water bath with a temperature of 37°C for 30 seconds. Then, the quality of sperms was evaluated in the parameters of motility, viability and abnormality. The state of sperm capacity was examined with triple staining at each sample, before and after capacitation. X and Y sperms were capacitated in two treatment media, i.e., TALP medium with 4 mM caffeine (I), or 4 mM caffeine combined with heparin 10 µg/ml (II). Unsorted sperm was used as a control. The research was conducted in five repetitions, by using X, Y, and unsorted sperms. The results showed that the motility of X dan Y sperms at the capacitation medium with caffeine and heparin was significantly higher (X₁=50.9%, X₂=48.6%, and Y=51.5%) compared to the capacitation medium only with caffeine (X₁=41.5%; X₂=43.9% and Y=41.3%). The same result was obtained from unsexed sperm. The viability of X dan Y sperm capacitated with medium II (X₁=66.9%, X₂=61.7%, and Y=60.3%), also resulted in a higher percentage compared to medium I (X₁=54.8%, X₂=50.6%, and Y=54.9%). The abnormality of X and Y sperms after capacitation at both treatment medium was not different significantly compared to unsorted sperm. Before capacitation, the percentages of X and Y sperms with acrosome reaction were lower (2.6% and 0.5%), but after capacitation, it resulted in increasing the number of sperms with acrosome reaction incapacitation, both on medium I and II. This result showed that sexing-sorted bull sperm with BSA column not resulting in the earlier acrosome reaction before capacitation.

Keywords: Acrosome reaction, BSA, capacitation, FH bull, sexing sperm

PENDAHULUAN

Peningkatan populasi ternak sapi di Indonesia dapat dioptimasi dengan melakukan inseminasi buatan menggunakan sperma hasil *sexing*, sehingga dapat dilahirkan pedet dengan jenis kelamin yang sesuai harapan (betina atau jantan), disesuaikan dengan kebutuhan peternak. Pemisahan sperma X dan Y menggunakan kolom

BSA dilakukan berdasarkan perbedaan motilitas antara sperma X dan Y dalam menembus larutan BSA (Hafez dan Hafez 2000), serta berdasarkan perbedaan ukuran DNA antara sperma X dan sperma Y. Rasio perbedaan DNA sperma X dan Y pada sapi sebesar 3,8% (Johnson dan Welch 1999). Pengembangan metode *sexing* sperma sapi dengan kolom *Bovine Serum Albumin* (BSA) sudah dikembangkan dan diaplikasikan di lapangan,

menghasilkan kesesuaian jenis kelamin anak sapi perah sebesar 81% dengan S/C sebesar 1,37 (Said et al. 2005)), hasil Gunawan et al. (2015) sebesar 87% (sperma X) dan 89,5% (sperma Y), sedangkan pada sapi simental sebesar 81,7% untuk sperma Y (Kaiin et al. 2008) dan pada sapi bali sebesar 76,7% (sperma X) (Gunawan et al. 2017).

Pemisahan sperma berdasarkan motilitas dan ukuran sperma menggunakan albumin (Hafez dan Hafez 2000, Yadav et al. 2017) merupakan salah satu metode pemisahan (*sexing*) jenis kelamin sperma. Pengembangan metode *sexing* menggunakan kolom BSA bertingkat dilakukan untuk menggantikan penggunaan albumen putih telur yang tidak stabil kualitas dan viskositasnya yang disebabkan oleh tidak seragamnya kualitas telur yang digunakan (Kaiin et al. 2003). BSA juga merupakan salah satu protein alami di dalam cairan plasma semen (Akhter et al. 2014), sehingga dapat digunakan sebagai bahan pengganti kuning telur pada medium pengencer semen. Penggunaan BSA dengan konsentrasi 10% atau 15% dapat menghasilkan kualitas *post-thawing* serupa dengan menggunakan Tris-kuning telur. Penggunaan BSA dilakukan untuk tujuan proteksi pada penyimpanan sperma pada temperatur 5°C. Penggunaan BSA pada medium kapasitas juga berfungsi untuk meningkatkan *efflux* pada membran plasma sel sperma (Matsuoka et al. 2006). Penggunaan BSA untuk memisahkan sperma X dan Y telah dilakukan sebelumnya dengan konsentrasi BSA yang berbeda dengan penelitian ini. Penggunaan BSA sebagai medium *sexing* sperma dimungkinkan karena BSA berfungsi untuk melindungi membran plasma dan memelihara integritas DNA sperma (Akhter et al. 2014).

Kapasitasi adalah proses maturasi sel sperma yang terjadi di dalam saluran reproduksi betina. Tanpa proses kapasitasi, spermatozoa tidak dapat memfertilisasi oosit (Garcia et al. 2015). Pada fertilisasi *in vitro*, proses kapasitasi sperma juga dilakukan dengan menggunakan medium kapasitasi yang mempunyai komposisi serupa dengan kondisi pada saluran reproduksi betina. Penambahan BSA pada medium kapasitasi dilakukan sebagai sumber kolesterol untuk menggantikan BSA yang terdapat dalam plasma semen yang sudah dihilangkan dan digantikan dengan medium pengencer (Garcia et al. 2015).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bahan yang digunakan untuk memisahkan jenis kelamin sperma dalam penelitian ini, yaitu BSA, dalam mempengaruhi kualitas sperma setelah diproduksi dan dibekukan, serta untuk mengetahui kualitas sperma *sexing* setelah dikapasitasi secara *in vitro* sehingga dapat diketahui potensi fertilitasnya.

BAHAN DAN METODE

Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Reproduksi, Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI.

Bahan penelitian

Sampel yang digunakan adalah *straw* beku sperma FH hasil *sexing* dengan metode kolom BSA bertingkat 3 kolom

dari sapi pejantan FH yang dipelihara di kandang ternak LIPI, Cibinong, Bogor, Jawa Barat.

Cara kerja

Pemisahan sperma (sexing)

Semen sapi pejantan FH dikoleksi dengan metode vagina buatan. Hasil koleksi kemudian diamati kualitas makroskopis dan mikroskopisnya. Semen yang memenuhi standar kualitas baik, kemudian diproses untuk dilakukan *sexing* sperma dengan kolom BSA bertingkat 5-10% selama 45 menit (Kaiin et al. 2013; Kaiin dan Gunawan 2016b). Setelah proses *sexing*, sperma yang dikoleksi dari masing-masing kolom BSA kemudian disentrifugasi di dalam medium *Brackett Oliphant* (BO) selama 10 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Pelet sel sperma kemudian ditambahkan dengan 1000 µl medium BO dan diamati kualitas spermanya secara mikroskopis, meliputi motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, dan abnormalitas. Kemudian sampel sperma diencerkan dengan menggunakan medium pengencer Tris kuning telur 20% (v/v) serta dikemas dalam *straw* 0,5 ml. Setelah itu, dilakukan ekuilibrasi pada suhu 5°C selama 3-4 jam, kemudian dibekukan di atas uap nitrogen cair.

Evaluasi semen beku hasil sexing

Penelitian ini menggunakan 5 ulangan untuk masing-masing sampel sperma X, Y, dan tidak di-*sexing* sebagai kontrol. *Straw* dicairkan (di-*thawing*) pada temperatur 37°C selama 30 detik di dalam *waterbath* (Meymert). Kemudian *straw* digunting menggunakan gunting *straw* dan sperma dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml kemudian disimpan di dalam *thermal block* (Minitub HT 300) dengan temperatur 37°C. Setelah didiamkan selama 2-3 menit, kemudian dievaluasi motilitas sperma pasca-*thawing* dengan menggunakan *Sperm Vision* (Minitub). Pembuatan apusan sperma pada kaca preparat dilakukan dengan pewarnaan Eosin-Nigrosin untuk pengamatan viabilitas dan abnormalitas. Pengamatan sampel dilakukan di bawah mikroskop cahaya (Olympus CX23) dengan perbesaran lensa okuler 10x dan perbesaran lensa objektif 10X dan 20X. Persentase viabilitas sperma dihitung dari jumlah sel sperma yang hidup (tidak berwarna) dibagi dengan jumlah total sel yang diamati dan dikalikan dengan 100% (untuk setiap 200 sel, dalam 5 lapang pandang dengan 3 kali ulangan). Penghitungan abnormalitas sperma juga dilakukan dengan cara yang sama. Pewarnaan akrosom dilakukan dengan menggunakan metode *triple staining* (Kovacs dan Foote 1992), yaitu dengan menggunakan pewarna *trypan blue* (Sigma), *neutral red* (Applichem), dan Giemsa 7,5% (Merck), dilakukan pada saat sebelum dan sesudah kapasitasi. Kapasitasi dilakukan dengan menggunakan dua perlakuan medium, yaitu medium *Tyrod's Albumine Lactate Pyruvate* (TALP) yang ditambahkan dengan kafein 4 mM dan medium TALP yang ditambahkan dengan kafein 4 mM dan heparin 10 µg/ml. Parameter yang diamati sesudah kapasitasi adalah motilitas, abnormalitas, dan reaksi akrosom. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan ANOVA untuk mengetahui pengaruh kapasitasi terhadap sperma hasil *sexing*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan terhadap motilitas sperma hasil *sexing* beku pascakapasitasi ditampilkan pada Tabel 1. Motilitas sperma tanpa *sexing* sebelum dikapasitasi menunjukkan hasil yang seragam, yaitu berkisar antara 56,6% sampai 57,3%. Perlakuan kapasitasi tampak sedikit menurunkan motilitas sperma. Motilitas sperma X₁, X₂, dan Y pada perlakuan medium kapasitasi mengandung kafein dan heparin (medium kapasitasi II) menghasilkan motilitas yang lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan motilitas pada perlakuan medium yang hanya mengandung kafein (medium kapasitasi I). Hasil serupa juga diperoleh pada sperma tanpa *sexing*.

Data hasil pengamatan terhadap viabilitas sperma hasil *sexing* pascakapasitasi ditampilkan pada Tabel 2. Pada penelitian ini, viabilitas sperma X dan Y menunjukkan hasil yang cenderung lebih tinggi pada medium kapasitasi II dibandingkan dengan medium kapasitasi I.

Pengamatan terhadap abnormalitas sperma hasil *sexing* pascakriopreservasi ditampilkan pada Tabel 3. Hasil yang diperoleh menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok perlakuan. Abnormalitas sperma yang ditemukan berkisar antara 5% sampai 13,8%.

Tabel 1. Persentase motilitas sperma hasil *sexing* beku pascakapasitasi

Jenis sperma	Sebelum kapasitasi	Perlakuan kapasitasi	
		TALP + Kafein 4 mM	TALP + Kafein + Heparin 10 µg/ml
Tanpa <i>sexing</i>	57,1	38,6 ^a	49,5 ^b
X ₁	56,6	41,5 ^a	50,9 ^b
X ₂	57,2	43,9 ^a	48,6 ^b
Y	57,3	41,3 ^a	51,5 ^b

Keterangan: Huruf *superscript* yang berbeda pada kolom berbeda, menunjukkan perbedaan yang nyata antarperlakuan ($p < 0,05$)

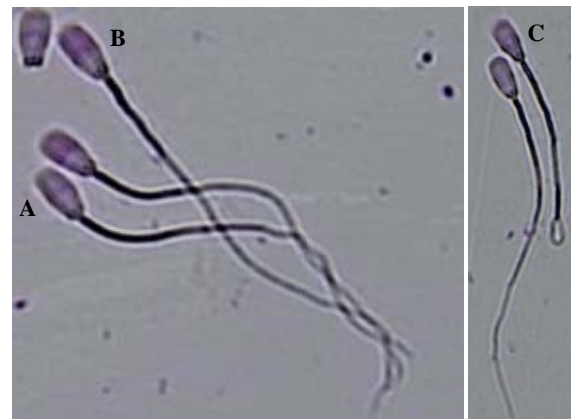
Tabel 2. Persentase viabilitas sperma hasil *sexing* beku pascakapasitasi

Jenis sperma	Sebelum kapasitasi	Perlakuan kapasitasi	
		TALP + Kafein 4 mM	TALP + Kafein + Heparin 10 µg/ml
Tanpa <i>sexing</i>	66,4	57,5	66,3
X ₁	57,3	54,8	60,9
X ₂	54,5	40,6	51,7
Y	53,3	44,9	50,3

Tabel 3. Persentase abnormalitas sperma hasil *sexing* beku pascakapasitasi

Jenis sperma	Sebelum kapasitasi	Perlakuan kapasitasi	
		TALP + Kafein 4 mM	TALP + Kafein + Heparin 10 µg/ml
Tanpa <i>sexing</i>	9,5	13,6	12,8
X ₁	10,8	13,8	11,8
X ₂	7,4	11,1	10,7
Y	5,0	11,5	10,4

Pengamatan terhadap status kapasitasi sperma hasil *sexing* beku dapat dilihat pada Tabel 4. Sebelum kapasitasi, persentase sperma yang mengalami reaksi akrosom rendah, baik pada sperma X, sperma Y, maupun sperma yang tidak di-*sexing*. Namun, setelah perlakuan kapasitasi, baik dengan medium I maupun medium II, terjadi peningkatan jumlah sperma yang mengalami reaksi akrosom pada sperma tanpa *sexing*, sperma X, dan sperma Y. Persentase sperma dengan akrosom utuh cukup tinggi pada saat sebelum kapasitasi, namun terjadi penurunan jumlah sperma yang utuh pada saat setelah kapasitasi, baik dengan medium I maupun medium II. Hal tersebut disebabkan terjadinya sperma yang mengalami reaksi akrosom setelah dikapasitasi. Persentase sperma yang mengalami kerusakan akrosom tampak tidak jauh berbeda antara sebelum dan sesudah kapasitasi. Sementara itu, sperma yang mengalami reaksi akrosom dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Status kapasitasi sperma: reaksi akrosom (A), akrosom utuh (B), akrosom rusak (C)

Tabel 4. Status kapasitasi sperma hasil *sexing* beku

Tahapan kapasitasi	Perlakuan	Jenis sperma	Status kapasitasi sperma		
			Reaksi akrosom	Akrosom utuh	Akrosom rusak
Sebelum	-	Tanpa <i>sexing</i>	6,8 ^a	68,6	24,6
		X ₁	2,6 ^a	65,0	32,4
		X ₂	1,7 ^a	79,1	18,8
		Y	0,4 ^a	93,0	5,2
Sesudah	Kafein	Tanpa <i>sexing</i>	38,6 ^b	47,0	14,4
		X ₁	22,0 ^b	57,6	20,4
		X ₂	26,7 ^b	49,8 ^c	20,6
		Y	35,6 ^b	42,6 ^c	21,8
	Kafein dan heparin	Tanpa <i>sexing</i>	37,2 ^b	46,8	16,0
		X ₁	28,2 ^b	56,4	15,4
		X ₂	29,9 ^b	48,2 ^c	17,9
		Y	33,6 ^b	44,0 ^c	22,4

Keterangan: Huruf *superscript* berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Kapasitasi secara *in vivo* ditujukan untuk meningkatkan fertilitas sperma pada saat memfertilisasi oosit. Selama proses tersebut, terjadi perubahan-perubahan pada akrosom yang ditandai dengan pelepasan enzim hyaluronidase dan zonalisin (Ciptadi 2012). Sementara itu, kapasitasi secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan medium kapasitasi yang dibuat menyerupai kondisi *in vivo* di dalam saluran reproduksi betina. Medium kapasitasi yang umum digunakan adalah medium *Brackett Oliphant* (BO) dan medium *Tyrode Albumin Lactate Pyruvate* (TALP). Pada penelitian ini digunakan medium TALP untuk menguji kualitas sperma hasil *sexing* pascakapasitasi. Penggunaan medium TALP lebih mendukung proses fertilisasi *in vitro* pada kerbau dibandingkan dengan medium BO (Hammam et al. 2010). Penambahan kafein pada medium TALP ditujukan untuk meningkatkan jumlah sperma yang terkapasitasi (Momezawa dan Fukud 2003), sedangkan heparin dapat menginduksi terjadinya reaksi akrosom (Parrish et al. 1985). Menurut Park dan Niwa (2009), kombinasi penambahan kafein dan heparin pada inkubasi sperma pasca-*thawing* sebelum proses fertilisasi *in vitro* secara nyata meningkatkan laju penetrasi oosit. Hasil yang sama juga diperoleh Niwa dan Ohgoda (1988) yang menyatakan bahwa penambahan kafein dan heparin secara bersama-sama lebih meningkatkan kapasitasi dan laju penetrasi oosit.

Penambahan kafein dan heparin pada medium TALP dapat meningkatkan motilitas sperma dibandingkan pada medium yang hanya ditambahkan kafein. Berdasarkan data pada Tabel 1, tampak bahwa motilitas sperma Y lebih tinggi dibandingkan dengan sperma X. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Hafez dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa motilitas sperma Y lebih cepat dari sperma X. Martecikova et al. (2010) menyatakan bahwa kafein digunakan untuk menstimulasi kapasitasi dan reaksi akrosom sperma. Hasil penelitian Nabavi et al. (2013) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan motilitas dan viabilitas antara sperma mencit yang dikapasitasi dengan kafein dengan tanpa kafein. Hasil penelitian Gunawan dan Kaiin (2016) pada sapi bali menghasilkan motilitas pasca-*thawing* sperma X sebesar 40,45% dan sperma Y sebesar 39,14%.

Keberhasilan inseminasi juga ditentukan oleh viabilitas sel sperma. Dari hasil penelitian terlihat bahwa viabilitas sperma pascakapasitasi dengan medium I maupun medium II sedikit menurun jika dibandingkan dengan viabilitas sperma sebelum dikapasitasi. Hasil ini menunjukkan bahwa proses kapasitasi tidak terlalu mempengaruhi viabilitas sperma X maupun sperma Y. Colas et al. (2010) menyatakan bahwa penambahan kafein mampu meningkatkan level cAMP dan kalsium intraseluler serta dapat menurunkan viabilitas sperma. Hasil yang dilaporkan oleh Kaiin dan Gunawan (2016a) pada sapi bali menghasilkan viabilitas pasca-*thawing* sebesar 69,20% (sperma X) dan 69,22% (sperma Y). Persentase abnormalitas sperma juga menentukan fertilitas pejantan. Menurut Arifiantini (2014), abnormalitas sperma terdiri dari dua kategori, yaitu abnormalitas primer yaitu kelainan

yang terjadi pada saat spermatogenesis, dan abnormalitas sekunder yaitu kelainan yang terjadi setelah tahap spermiasi. Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk produk sperma sapi beku, mensyaratkan abnormalitas sperma di bawah 20%. Pada penelitian ini, abnormalitas sperma yang ditemukan berada di bawah nilai tersebut, sehingga kualitas sperma hasil *sexing* yang diproduksi masih sesuai SNI. Dibandingkan dengan hasil Kaiin dan Gunawan (2016a), abnormalitas sperma pasca-*thawing* pada penelitian ini masih lebih tinggi. Pada sapi bali, abnormalitasnya berkisar 5%. Hasil pengamatan abnormalitas pada sperma hasil *sexing* kerbau belang menunjukkan abnormalitas ekor melipat dan *pear shape* pada sperma X serta abnormalitas ekor melipat dan abaxial pada sperma Y (Kaiin et al. 2017).

Susilawati (2011) menyatakan bahwa kapasitasi adalah serentetan perubahan yang membuat spermatozoa mampu mengalami reaksi akrosom. Pada penelitian ini, tampak bahwa sebelum dilakukan kapasitasi, persentase sperma hasil *sexing* yang mengalami reaksi akrosom sangat rendah. Dengan proses perlakuan kapasitasi, baik dengan medium I maupun medium II, secara nyata meningkatkan persentase sperma X dan Y yang mengalami reaksi akrosom serta menurunkan persentase sperma X dan Y yang mempunyai akrosom utuh. Hal tersebut diduga karena sperma mengalami reaksi akrosom. Spermatozoa tidak akan mengalami reaksi akrosom jika belum terkapasitasi secara utuh. Reaksi akrosom dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan kapasitasi (Susilawati 2011). Hasil menunjukkan bahwa belum semua sperma berada pada tahapan reaksi akrosom, karena reaksi akrosom akan terjadi pada saat sperma menempel pada zona pelusida oosit. Menurut Susilawati (2011), reaksi akrosom bertujuan untuk membantu spermatozoa menembus zona dan meleburkan selaput plasma oosit (sel telur). Reaksi akrosom biasanya terjadi selama 10-15 menit dan diinduksi oleh pertemuan antara reseptor membran spermatozoa dengan ZP3 pada zona pelusida.

Penggunaan BSA sebagai medium *sexing* sperma ditemukan tidak menyebabkan terjadinya reaksi akrosom pada sperma X maupun sperma Y. Tampak pada Tabel 4, bahwa sebelum kapasitasi, persentase sperma yang mengalami reaksi akrosom sangat rendah, yaitu sebesar 0,4% pada sperma Y dan 2,6% pada sperma X. Medium kapasitasi pada umumnya mengandung BSA, kalsium, dan bikarbonat. BSA digunakan pada medium kapasitasi sebagai penyedia kolesterol yang berperan dalam proses reaksi akrosom (Garcia et al. 2015). Penggunaan BSA selama proses *sexing* tidak mempengaruhi status kapasitasi sperma hasil *sexing* beku pasca-*thawing* sebelum dikapasitasi.

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa kapasitasi sperma X dan sperma Y hasil *sexing* menggunakan medium TALP dengan penambahan kafein dan/atau heparin menyebabkan terjadinya peningkatan sperma yang mengalami reaksi akrosom. Proses *sexing* sperma menggunakan kolom BSA bertingkat tidak menyebabkan terjadinya reaksi akrosom lebih awal.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhter S, Rakha BA, Iqbal R et al. 2014. Effect of bovine serum albumin on motility, plasmalemma, viability and chromatin integrity of buffalo bull spermatozoa. *Pakistan J Zool* 46 (1): 115-120.
- Arifiantini RI. 2014. Teknik koleksi dan evaluasi semen pada hewan. IPB Press, Bogor.
- Ciptadi G. 2012. Bioteknologi sel gamet dan kloning hewan. UB Press, Malang.
- Colas C, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T. 2010. Caffeine induces ram sperm hyperactivation independent of cAMP-dependent protein kinase. *Int J Androl* 33: 187-197.
- Garcia BM, Fernandez LG, Loux SC et al. 2015. Effect of calcium, bicarbonate and albumin on capacitation-related events in equine sperm. *Reproduction* 149: 87-99.
- Gunawan M, Kaiin EM, Said S. 2015. Aplikasi inseminasi buatan dengan sperma *sexing* dalam meningkatkan produktivitas sapi di peternakan rakyat. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 1 (1): 93-96.
- Gunawan M, Kaiin EM. 2016. Aplikasi teknologi *sexing* sperma sapi Bali di Techno Park Banyumulek Nusa Tenggara Barat. *Prosiding Kongres Teknologi Nasional*.
- Gunawan M, Kaiin EM, Ridwan R. 2017. Peningkatan produktivitas sapi Bali melalui inseminasi buatan dengan sperma *sexing* di Techno Park Banyumulek, Nusa Tenggara Barat. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 3 (2): 216-219.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hammam AM, Whisnant CS, Elias A et al. 2010. Effect of media, sera, and hormones in vitro maturation and fertilization on water buffalos (*Bubalus bubalis*). *J Anim Vet Adv* 9 (1): 27-31.
- Johnson LA, Welch GR. 1999. Sex preselection: High speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. *Theriogenology* 52: 1323-1341.
- Kaiin EM, Tappa B, Said S, et al. 2003. Aplikasi bioteknologi untuk produksi bibit sapi yang sudah diketahui jenis kelaminnya. Laporan Teknik. Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong.
- Kaiin EM, Gunawan M, Tappa B. 2008. Aplikasi IB dengan sperma hasil pemisahan di Sumatera Barat. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner* 2007: 93-96.
- Kaiin EM, Gunawan M, Afiati F et al. 2013. Production of frozen *sexing* sperm separated with BSA column method with standardized on artificial insemination center. *Proceedings International Conference on Biotechnology*. Bogor, 13-14 November 2012.
- Kaiin EM, Gunawan M. 2016a. Potensi pejantan sapi Bali di BIBD Banyumulek NTB untuk produksi sperma *sexing*. *Prosiding Kongres Teknologi Nasional*. Jakarta.
- Kaiin EM, Gunawan M. 2016b. Metode pemisahan jenis kelamin spermatozoa (*sexing*) dengan *Bovine Serum Albumin* 3 kolom. Paten terdaftar pada Ditjen HAKI no P00201604893.
- Kaiin EM, Gunawan M, Maulana T. 2017. Morphometry and abnormality evaluation of sex-sorted sperm of spotted buffalo (*Tedong bonga*). *Nus Biosci* 9 (2): 175-180.
- Kovács A, Foote RH. 1992. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem* 67: 119-124.
- Martecikova S, Hulinska P, Reckova Z et al. 2010. Effect of acrosome reaction progress in frozen-thawed boar spermatozoa on the efficiency of in vitro oocyte fertilization. *Vet Med* 55 (9): 429-437.
- Matsuoka T, Imai H, Kohno H et al. 2006. Effect of BSA and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J Reprod Dev* 52 (5): 675-683.
- Momozawa K, Fukud Y. 2003. Caffeine in fertilization medium is not essential for bovine IVF by fully capacitated spermatozoa. *J Reprod Dev* 49 (6): 507-512.
- Nabavi N, Todehdehghan F, Shiravi A. 2013. Effect of caffeine on motility and viability of sperm and in vitro fertilization of outbreed mouse in T6 and m16 media. *Iran J Reprod Med* 11 (9): 741-746.
- Niwa K, Ohgoda W. 1988. Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology* 30: 733-741.
- Park KW, Niwa K. 2009. Bovine oocyte can be penetrated in modified Tris buffered medium. *Asian-Australas J Anim Sci* 22 (4): 500-506.
- Parrish JJJ, Susho-Parrish, First NL. 1985. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology* 24: 537-549.
- Said S, Kaiin EM, Tappa B. 2005. Produksi anak sapi potong dan perah berjenis kelamin sesuai harapan. *Prosiding Seminar Nasional Industri Peternakan Modern II*. Mataram. Hal 209-216.
- Susilawati T. 2011. *Spermatology*. UB Press. Malang.
- Yadav SK, Gangwar DK, Singh J, Tikadar CK, Khanna VV, et al. 2017. An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X-and Y-chromosome. *Veterinary World* 10 (5): 498-504.