

KUALITAS SPERMATOZOA POST THAWING SEMEN BEKU SPERMA Y HASIL SEXING PADA SAPI LIMOUSIN

The quality of spermatozoa post thawing sperm y frozen semen results from sexing in Limousine

Ali Mahfud¹⁾, Nurul Isnaini²⁾, Aulia Puspita Anugra Yekti²⁾, Kuswati²⁾, Trinil Susilawati²⁾

¹⁾ Post Graduate Student Animal Science Faculty, Brawijaya University

²⁾ Lecturer Animal Science Faculty, Brawijaya University

E-mail: alimahfud5758@gmail.com dan trinilsusilawati@yahoo.com

Submitted 15 May 2019, Accepted 20 June 2019

ABSTRAK

Kualitas spermatozoa pada semen beku sexing sangat penting dalam menunjang keberhasilan inseminasi buatan untuk mendapatkan pedat dengan jenis kelamin sesuai harapan. Tujuan penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas semen beku semen beku non sexing dan sexing secara makroskopis dan mikroskopis. Materi dalam penelitian menggunakan starw semen beku non sexing dan sexing dengan metode pemisahan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll (SGDP) sapi Limousin yang diproduksi oleh Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Malang. Metode penelitian ini menggunakan eksperimental dengan percobaan labolatorium (*laboratory experiment*). Variabel penelitian meliputi keadaan umum meliputi tahun produksi straw, secara makroskopis meliputi pH semen beku dan secara mikroskopis meliputi persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi dan total spermatozoa motil. Data yang diperoleh diolah *Microsoft Excel* dengan analisis Ragam *Analysis of variance* (Anova) *single factor* dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian yaitu semen beku non sexing dan sexing meliputi keadaan umum diproduksi tahun 2012 dan 2018, kualitas secara makroskopis memiliki nilai pH sebesar 6,67 dan 6,60 dan kualitas secara mikroskopis memiliki persentase motilitas sebesar 36,00 % dan 31,40 %, viabilitas sebesar 81,70 % dan 75,89 %, abnormalitas sebesar 6,93 % dan 6,78 %, konsentrasi spermatozoa sebesar 31,67 juta/ mini straw dan 12,125 juta/ mini straw dan total spermatozoa motil sebesar 11,39 juta/mini straw dan 5,10125 juta/mini straw. Kesimpulan penelitian bahwa Kualitas *post thawing* semen beku non sexing lebih tinggi daripada semen beku sexing menggunakan metode SGDP baik secara makroskopis maupun mikroskopis.

Kata kunci: Sexing, *post thawing motility*, konsentrasi dan spermatozoa

How to cite : Mahfud, A., Isnaini, N., Yekti, A.P.A., Kuswati., & Susilawati, T. 2019. Kualitas Spermatozoa Post Thawing Semen Beku Sperma Y Hasil Sexing Pada Sapi Limousin. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production Vol 20, No 1 (1-7)*

ABSTRACT

The quality of spermatozoa in sexing frozen semen is very important in supporting the success of artificial insemination in order to get the mate with sex as expected. The aim of this study was to determine the quality of macroscopic and microscopic frozen semen of non sexing and sexing frozen semen. The material in the study used non sexing and sexing frozen semen starw with the Percoll Density Gradient Centrifugation (SGDP) separation method of Limousin cattle produced by the Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Malang. This research method uses experimental with laboratory experiments. Research variables include general conditions including straw production years, macroscopically including frozen semen pH and microscopically including percentage of motility, viability, abnormality, concentration and total motile spermatozoa. The data obtained was processed by Microsoft Excel with analysis of Variance Analysis of variance (Anova) single factor analyzed descriptively. The results of the study were non-sexing and sexing frozen semen covering general conditions produced in 2012 and 2018, the quality macroscopically had a pH value of 6.67 and 6.60 and the quality microscopically had a percentage of motility of 36.00% and 31.40%, viability of 81.70% and 75.89%, abnormalities of 6.93% and 6.78%, concentrations of spermatozoa of 31.67 million / mini straw and 12.125 million / mini straw and total motile spermatozoa of 11.39 million / mini straw and 5.10125 million / mini straw. The conclusion of the study was that the quality of post thawing of non-sexing frozen semen was higher than that of sexing frozen semen using the SGDP method both macroscopically and microscopically.

Keywords: Sexing, post thawing motility, concentration and spermatozoa

PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) dikembangkan dalam rangka untuk mempercepat dan memperbanyak keturunan secara efisien dengan menggunakan seekor pejantan unggul. Penentuan jenis kelamin sebelum melahirkan lebih menguntungkan dan efisien, selain menekan biaya pemeliharaan juga dapat menunjang dalam program *breeding*. Semen sexing adalah salah satu bioteknologi reproduksi untuk menentukan jenis kelamin keturunan dengan cara memisahkan antara spermatozoa kromosom X dan Y (sperma X dan Y).

Teknik pemisahan spermatozoa didasarkan pada kecepatan gerak spermatozoa yang diberi pada sebuah gradien (Hafez and Hafez, 2008). Metode pemisah menggunakan sentrifugasi gradien densitas percoll (SGDP) lebih baik dan dapat dibuat dengan mudah jika dibandingkan dengan metode lain (Susilawati, 2014). Proses sentrifugasi menyebabkan gesekan secara mekanik antara sel spermatozoa dengan medium

pemisah yang menyebabkan kerusakan struktur sel membran dan gangguan metabolisme (Berg, *et al*, 2005) dan akan menurunkan kualitas mencapai 20% (Sianturi, dkk, 2004). Hasil pemisahan menggunakan metode SGDP kecepatan 2250 rpm selama 5 menit menghasilkan rasio spermatozoa sebesar 83,1% dengan penurunan motilitas 10% berdasarkan identifikasi ukuran kepala spermatozoa (Susilawati, 2014).

Hasil penelitian Susilawati *et al*, (2014) dengan menggunakan metode yang sama PTM pada semen beku sexing $36,5 \pm 13,13$ % dan Kusumawati *et al*, (2017) menyatakan bahwa semen non sexing dan spermatozoa Y hasil sexing sebelum pembekuan memiliki motilitas sebesar $64,25 \pm 3,94$ % dan $48,55 \pm 8,28$ %, viabilitas sebesar $95,07 \pm 0,99$ % dan $85,15 \pm 0,84$ % seras abnormalitas sebesar $0,93 \pm 0,28$ % dan $4,42 \pm 0,36$ %. Kualitas semen beku merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas semen beku non sexing dan sexing

baik setelah penyimpanan pada nitrogen cair suhu 196 °C secara makroskopis maupun mikroskopis.

MATERI DAN METODE

Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan pada tanggal 15 Oktober 2018. Uji kualitas spermatozoa *Post Thawing* dilakukan di Laboratorium Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.

Materi dan metode penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 10 straw semen beku spermatozoa Y hasil sexing dan 3 straw semen beku non sexing sapi Limousine yang diproduksi oleh Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Malang. Menurut, SNI 4869-1: 2017 bahwa minimal pengambilan sampel uji minimal 2 (dua) straw. Semen beku spermatozoa Y hasil sexing dipisahkan menggunakan metode *Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll* (SGDP). Penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium (*laboratory experiment*).

Variabel pengamatan

Variabel yang diamati meliputi:

1. Keadaan umum yaitu tahun produksi semen beku.
2. Keadaan makroskopis yaitu volume dan pH semen beku.
3. Keadaan mikroskopis yaitu motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi spermatozoa dan total spermatozoa motil.

Variabel pengamatan

Data yang diperoleh diolah *Microsoft Excel* dengan analisis Ragam *Analysis of variance* (Anova) *single factor* dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semen beku non sexing dan sexing didapatkan dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Malang, dalam bentuk mini straw lalu dibawa ke laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya untuk dilakukan pengujian kualitas semen beku *post thawing*. Hasil uji kualitas tersebut dapat dilihat pada Tabel 1. Di bawah ini.

Tabel 1. Kualitas spermatozoa semen beku non sexing dan sexing *post thawing*.

Parametar Pengamatan	Uji Kualitas Semen Beku	
	<i>Non Sexing</i> (Rata-Rata ± SD)	<i>Sexing</i> (Rata-Rata ± SD)
Keadaan Umum		
Total Straw (n)	3	10
Tahun Produksi	2018	2012
Keadaan Makroskopis		
Volume (ml)/mini straw	0,25	0,25
pH	6,67 ± 0,58	6,60 ± 0,52
Keadaan Mikroskopis		
Motilitas (%)	36,00 ± 1,00	31,40 ± 1,84
Viabilitas (%)	81,70 ± 1,15	75,98 ± 4,49
Abnormalitas (%)	6,93 ± 1,37	6,78 ± 1,63
Konsentrasi (Juta)/mini straw	31,67 ± 3,82	12,125 ± 4,19
Total Spermatozoa Motil (Juta)/mini straw	11,39 ± 1,30	5,10125 ± 1,44

pH Semen Beku Non Sexing dan Sexing

Pengukuran pH semen untuk mengetahui kadar keasaman pada semen beku akibat proses pengenceran, pendinginan, pembekuan dan thawing. Pada Tabel 1. menunjukkan bahwa nilai pH pada semen beku non sexing adalah $6,67 \pm 0,58$ sedangkan pH semen sexing adalah $6,60 \pm 0,52$. pH semen beku setelah thawing antar perlakuan hampir sama dan secara statistik tidak memberikan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Pada penelitian ini thawing dilakukan pada suhu 37°C selama 20-30 detik. Menurut, Utomo dan Boquifai (2010) menyatakan bahwa pada temperatur 37°C aktifitas pergerakan spermatozoa relatif sama dengan pergerakan dalam alat reproduksi betina.

Menurut, Sholihati, dkk (2008) menyatakan bahwa kalsium berfungsi sebagai pemacu pergerakan spermatozoa. Semakin tinggi kadar kalsium dalam sel spermatozoa akan terpacu untuk bergerak cepat dengan membutuhkan energi banyak dan menghasilkan asam laktat yang banyak. Asam laktat yang tinggi akan mempengaruhi daya hidup spermatozoa karena spermatozoa rentan terhadap pH asam.

Motilitas Spermatozoa Semen Beku Non Sexing dan Sexing

Motilitas merupakan kemampuan daya gerak spermatozoa. Pergerakan ini digunakan sebagai tolok ukur fertilitas sel spermatozoa karena pergerakan yang progresif tersebut diharapkan mampu mempercepat pertemuan dengan sel telur (ovum) untuk proses fertilisasi dalam saluran reproduksi betina. Motilitas spermatozoa setelah thawing atau *post thawing motility* (PTM) adalah daya gerak spermatozoa setelah di thawing.

Berdasarkan Tabel 1. bahwa motilitas spermatozoa semen beku non sexing dan sexing setelah thawing yaitu sebesar $36,00 \pm 1,00$ % dan $31,40 \pm 1,84$ %. Motilitas spermatozoa setelah thawing pada semen beku non sexing lebih tinggi daripada semen beku sexing. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa antar perlakuan

menunjukkan perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa.

Perbedaan daya gerak antar perlakuan diduga karena semen sexing motilitasnya menurun saat pemisahan akibat sentrifugasi. Sentrifugasi menyebabkan pergesekan antara spermatozoa dengan medium dan antara spermatozoa lainnya yang akan menyebabkan merusak struktur membran sel spermatozoa. Menurut, Susilawati, *et. al.*, (2014) menyatakan bahwa proses sentrifugasi akan mempengaruhi stuktur dan fungsi membran spermatozoa dan akan memutuskan antara kepala dan ekor spermatozoa. Selama penyimpanan dan thawing terjadi penurunan motilitas dan viabilitas sekitar 50 %. Menurut, Fraser, Strzezek and Kordan (2014) menyatahkan bahwa penyimpanan dalam waktu yang lama memiliki efek pada motilitas, fungsi mitokondria dan integritas membran plasma spermatozoa.

Proses pemisahan dan pembekuan serta pencairan kembali (thawing) pada semen beku spermatozoa Y hasil sexing adalah penyebab utama rendahnya kualitas spermatozoa setelah thawing. Penurunan kualitas spermatozoa setelah thawing akan mengurangi kemampuan fertilisasi dan berefek terhadap perkembangan embrio (Khalil, *et. al.*, 2018). Hal ini sesuai dengan pendapat, Rumende, dkk (2007) bahwa rusaknya struktur membran mengakibatkan kadar kalsium intraseluler pada spermatozoa meningkat yang akan menurunkan motilitas, penurunan viabilitas, penurunan integritas membran dan mengalami kapasitasi.

Viabilitas Spermatozoa Semen Beku Non Sexing dan Sexing

Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa yang diketahui dengan mengamati jumlah spermatozoa hidup dan mati dengan pewarnaan eosin negrosin. Spermatozoa yang mati akan menyerap larutan eosin menjadi merah muda. Penyerapan warna tersebut dikarenakan terjadi kerusakan pada membran sel yang diduga akibat pengolahan semen. Berdasarkan Tabel 1. menunjukkan bahwa daya hidup spermatozoa semen beku non

sexing dan sexing adalah $81,70 \pm 1,15$ % dan $75,89 \pm 4,49$ %. Daya hidup spermatozoa non sexing lebih tinggi daripada spermatozoa sexing. Secara statistik bahwa daya hidup spermatozoa non sexing dan sexing menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup spermatozoa. Perbedaan antar perlakuan tersebut dikarenakan semen sexing terjadinya kerusakan pada saat proses pemisahan.

Proses sentrifugasi saat pemisahan spermatozoa (sexing) menyebabkan terjadinya pergesekan antara spermatozoa dengan medium dan spermatozoa yang lain sehingga terjadi kerusakan membran sel. Hal ini sesuai dengan pendapat Berg, *et al.*, (2005) bahwa terjadinya gesekan saat pemisahan akan menyebabkan metabolisme sel terganggu akibat dari transpor ion kalsium ke dalam dan keluar tidak stabil. Meningkatnya permeabilitas membran terhadap ion-ion, termasuk ion kalsium sehingga akan berakibat terhadap meningkatnya ion kalsium dalam sitosol yang diikuti dengan meningkatnya ion kalsium dalam mitokondria yang akan mengakibatkan kematian pada spermatozoa (Al Aslam, Dasrul dan Rosmaidar, 2014).

Abnormalitas Spermatozoa Semen Beku Non Sexing dan Sexing

Abnormalitas merupakan kelainan spermatozoa akibat sebelum dan sesudah pengolahan semen. Pada Tabel 1. Menunjukkan bahwa abnormalitas pada semen beku non sexing sebesar $6,93 \pm 1,37$ % dan semen beku sexing $6,78 \pm 1,63$ %. Secara deskriptif bahwa abnormalitas spermatozoa setelah thawing antar perlakuan tidak jauh berbeda walaupun abnormalitas non sexing lebih tinggi 0,15 % dan secara statistik bahwa antar perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa setelah thawing.

Abnormalitas terjadi diduga karena membran sel spermatozoa mengalami kerusakan yang menyebabkan membran sel tidak stabil akibat pengolahan semen mulai dari proses penampungan, pengenceran, penyimpanan dan penanganan setelah penyimpanan. Menurut, Sholihati, dkk.

(2008) menyatakan bahwa peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa selama proses pendinginan dan pembekuan disebabkan oleh cekaman dingin/cold shock, ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolisme yang terus berlangsung selama penyimpanan. Yulnawati dan Setiadi (2005) menyatakan bahwa keberadaan zat yang bersifat toksik baik yang berasal dari spermatozoa yang telah mati maupun yang berasal dari zat yang terkandung dalam pengencer yang telah mengalami oksidasi akibat penyimpanan dapat menyebabkan tingginya kadar radikal bebas yang dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa. Menurut, Rumende, dkk. (2007) menyatakan bahwa perubahan ini dapat mempengaruhi seluler air dan konsentrasi ion yang akan merusak akrosom dan ekor spermatozoa yang mudah rusak saat pengulangan.

Konsentrasi Semen Beku Non Sexing dan Sexing

Konsentrasi spermatozoa adalah jumlah sel spermatozoa pada volume semen. Pada Tabel 1. menunjukkan bahwa setiap mini straw memiliki volume 0,25 ml. Rata-rata konsentrasi spermatozoa semen beku non sexing sebanyak $31,67 \pm 3,82$ juta/0,25 ml dan semen beku sexing $12,125 \pm 4,19$ juta/0,25 ml. Secara deskriptif bahwa konsentrasi semen beku non sexing lebih tinggi daripada semen beku sexing dan secara statistik menunjukkan bahwa antar perlakuan memberikan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap konsentrasi spermatozoa. Perbedaan ini diduga akibat tidak sempurnanya proses *filling* dan *sealing* saat pengemasan, karena pada saat pengujian terdapat straw yang terdapat rongga udara.

Total Spermatozoa Motil Semen Beku Non Sexing dan Sexing

Total spermatozoa motil merupakan jumlah spermatozoa yang diduga fertil berdasarkan jumlah konsentrasi spermatozoa yang memiliki motilitas progresif. Pada Tabel 1. menunjukkan bahwa total spermatozoa motil pada semen

beku non sexing lebih tinggi dibandingkan dengan total spermatozoa motil yaitu sebanyak $11,39 \pm 1,30$ juta/mini straw dan $5,10125 \pm 1,44$ juta/mini straw. Secara statistik bahwa antar perlakuan memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap total spermatozoa motil spermatozoa ($P < 0,01$). Proses pemisahan pada semen beku spermatozoa Y hasil sexing adalah penyebab utama rendahnya kualitas spermatozoa setelah thawing. Hal ini sesuai dengan pendapat Sianturi, dkk, (2004) bahwa akibat proses sentrifugasi selama proses pemisahan akan menurunkan kualitas mencapai 20%. Penurunan kualitas spermatozoa setelah pemisahan terjadi akibat dari banyaknya energi yang dibutuhkan untuk menjaga kondisi normalnya, apabila tidak terpenuhi maka motilitas akan turun dan akan mati (Aji, dkk, 2017).

KESIMPULAN

Kualitas *post thawing* semen beku non sexing lebih tinggi daripada semen beku sexing menggunakan metode SGDP yaitu nilai pH sebesar 6,67 dan 6,60, persentase motilitas sebesar 36,00 % dan 31,40 %, viabilitas sebesar 81,70 % dan 75,89 %, abnormalitas sebesar 6,93 % dan 6,78 %, konsentrasi spermatozoa sebesar 31,67 juta/mini straw dan 12,125 juta/mini straw dan total spermatozoa motil sebesar 11,39 juta/mini straw dan 5,10125 juta/mini straw. Perlu dilakukan evaluasi lebih lanjut tentang kualitas membran sel spermatozoa semen beku hasil sexing.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada pembimbing utama dan pembimbing pendamping, team penelitian, pusat studi ternak pedaging Universitas Brawijaya dan Bank Indonesia (BI).

DAFTAR PUSTAKA

Aji, R., Panjono, Agus, A., Widyobroto, B. P., Hartatik, T., Budisatria, I. G. S., Bintara. (2017). Kinerja reproduksi sapi betina sumba ongole yang di inseminasi dengan semen beku sapi

jantan belgian blue. *Buletin Peternakan*, 41(4), 379–384.

Berg, G., Zachow, C., Lottmann, J., Gotz, M., Costa, R., & Smalla, K. (2005). Impact of plant species and site on rhizosphere-associated fungi antagonistic to *verticillium dahliae* kleb. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4203–4213. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4203-4213.2005>

Fraser, L., Strzeżek, J., & Kordan, W. (2014). Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*, 147(3–4), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.010>

Hasan Al Aslam, S. K., Dasrul, & Rosmaidar. (2014). Pengaruh penambahan vitamin C dalam pengencer andromed® terhadap persentase motilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan. *Medika Veterinaria*, 8(1), 20–26.

Khalil, W. A., El-Harairy, M. A., Zeidan, A. E., Hassan, M. A., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, S49–S56. <https://doi.org/10.1016/J.IJVSM.2017.11.001>

Rumende, R. H. R., Kalim, H., Aris Widodo, M., & Sasmito Djati, M. (2007). Peningkatan kualitas spermatozoa pada proses pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll melalui pemberian fosfolipid. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23(2), 71–81. <https://doi.org/10.21776/ub.jkb.2007.023.02.3>

Sholihati, N., Idi, R., Rasad, S. D., Rizal, M., & Fitriati, M. (2008). Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi peranakan ongole (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-50C. *Animal Production*, 10(1), 22–29.

- Sianturi, R. G., Situmorang, P., Triwulaningsih, E., & Kusumaningrum, D. A. (2004). Pengaruh isobutil metilixantina (IMX) dan Waktu pemisahan terhadap kualitas dan efektifitas pemisahan spermatozoa dengan metode kolom albumin putih telur. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner*, 9, 246–251.
- Susilawati, T., Kusumawati, E. D., Isnaini, N., Yekti, A. P. A., Sudarwati, H., & Ridhowi, A. (2017). The effect of sexing process by using density gradient centrifugation percoll and frozen method to sperm motility and membrane damage of ongole crossbred bull. *Asian Jr.of Microbiol.Biotech.Env.Sc*, 19(1), 189–199. <https://doi.org/10.2991/icoh-17.2018.44>
- Susilawati, T., Rahayu, S., Udrayana, S., Sudarwati, H., & Nugroho, E. (2014). Effect of different centrifugation duration on simmental bull sperm quality and membrane status after sexing, cooling and freezing processes. *Journal of Sustainable Agriculture*, 8(7), 28–34.
- Utomo, S., & Boquifai, E. (2010). Pengaruh temperatur dan lama thawing terhadap kualitas spermatozoa sapi dalam penyimpanan straw beku. *Sains Peternakan*, 8(1), 22–25.
- Yulnawati, & Setiadi, M. A. (2005). Motilitas dan keutuhan plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 40C. *Media Kedokteran Hewan*, 21(3), 100–104.