

HUBUNGAN ANTARA VIABILITAS, MOTILITAS DAN KEUTUHAN MEMBRAN PLASMA SPERMATOZOA SEMEN BEKU SAPI LIMOUSIN

R Septiyani¹, RI Arifiantini², T Susnawati³

¹Mahasiswa PPDH Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

²Staf Pengajar Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

³Balai Inseminasi Buatan Lembang, Bandung

ABSTRACT

Limousine is one of popular beef cattle among farmers. According to Indonesian National Standard (INS), the quality of frozen semen that distribute and inseminate to the cattle must have a post-thawing motility >40% and individual scoring >2. This study aimed to test the quality of Limousine frozen semen with different parameters, namely the percentage of sperm motility, viability (indicator of viable sperm), and percentage of plasma membrane integrity (MI) and to find out the relationship between those three parameters. The motility was assess subjectively by three evaluator. The sperm viability assess with eosin nigrosin stain and membrane integrity (MI) was test using hypo osmotic swelling (HOS) test. The data were analyzed using the Pearson correlation SPSS 16 for windows. Among the four individual Limousin showed that whole frozen semen is still in good condition and the post thawing motility of all bulls was qualified according to INS semen production. There was a positive correlation between motility and viability, motility and MI as well as viability and membrane integrity.

Key words: Correlation, Sperm Parameters, Limousine, Frozen Semen

PENDAHULUAN

Salah satu jenis sapi potong yang digunakan sebagai pejantan unggul yang diproduksi menjadi semen beku adalah sapi Limousin. Bibit semen beku sapi Limousin saat ini di produksi di beberapa Balai Inseminasi Buatan (BIB) diantaranya adalah Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Lembang di Jawa Barat dan BBIB Singosari di Jawa Timur. Dalam perkembangannya, BBIB Lembang telah memproduksi semen beku unggul lebih dari 22 juta dosis yang telah disebarakan ke daerah-daerah pelaksana IB di Indonesia (Trantono 2011).

Kualitas semen beku yang didistribusikan ke peternak harus lolos dalam serangkaian uji, diantaranya adalah harus memiliki persentase motilitas *post thawing* (PTM) >40%, skoring individu >2 (SNI 01-4869.1-2005). Menurut Morrell dan Rodriguez-Martinez (2009), spermatozoa yang mampu membuahi adalah spermatozoa yang motil, *viable*, morfologi normal dan mempunyai kromatin yang *intact*. Berdasarkan hal tersebut dan mengingat SNI 01-4869.1-2005 yang hanya menguji aspek motilitas maka penelitian ini bertujuan untuk menguji kualitas semen beku dengan beberapa parameter yaitu motilitas, viabilitas (ratio spermatozoa hidup dan mati), dan keutuhan membran plasma spermatozoa semen beku sapi Limousin serta mengetahui hubungan antara ketiga parameter tersebut.

MATERI DAN METODE

Thawing semen beku

Semen di-*thawing* pada *water bath* (37°C) selama 30 detik. Setelah itu *straw* dikeringkan dengan menggunakan tisu, lalu sumbat pabrik dan sumbat laboratorium digunting. Semen dari *straw* dikeluarkan seluruhnya dan disimpan dalam tabung Eppendorf. Tabung diletakkan dalam *water bath* pada suhu 37°C untuk pengujian lebih lanjut.

Motilitas Spermatozoa

Sebanyak satu tetes semen diletakkan di atas gelas objek yang telah dihangatkan, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Motilitas spermatozoa dinilai dengan cara subjektif kuantitatif dari lima lapang pandang menggunakan mikroskop (Olympus CH 20) dengan perbesaran 400X (10x40). Penilaian dilakukan dengan membandingkan spermatozoa yang bergerak progresif dengan gerakan lain yang tidak progresif dan dinyatakan dalam persentase (%).

Viabilitas Spermatozoa

Sebanyak satu tetes semen diletakkan di atas gelas objek dan ditambahkan 3-4 tetes pewarna eosin nigrosin dan dihomogenkan kemudian dibuat preparat ulas dan dikeringkan dengan meja pemanas (*heating table*). Preparat lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 X. Spermatozoa dihitung dalam sepuluh lapang pandang dengan cara diacak (atau jumlah yang dihitung telah mencapai 200 spermatozoa). Spermatozoa hidup tidak menyerap warna eosin sedangkan spermatozoa mati akan menyerap warna eosin (merah).

Plasma Utuh Spermatozoa

Sebanyak 50 µl semen dimasukkan ke dalam 400 µl larutan *hypo-osmotic* bertekanan 150 mOsm kg⁻¹ yang terdiri atas 0.735g Na sitrat dan 1.351g Fruktosa dalam 100 ml aquadest (Revell dan Mrode 1993). Campuran larutan diinkubasi dalam *water bath* (37°C). Spermatozoa dalam larutan HOS diamati pada menit ke 30-45. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400X pada sepuluh lapang pandang. Spermatozoa dengan membran plasma utuh akan memperlihatkan ekor yang melingkar (*coil*), sedangkan spermatozoa dengan membran plasma yang tidak utuh akan memperlihatkan ekor yang lurus.

Analisis Data

Seluruh parameter diperiksa dari empat individu yang berbeda, masing-masing individu dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Data yang diperoleh diolah dengan mencari rata-rata dan simpangan bakunya serta dicari korelasi antara tiga indikator tersebut dengan menggunakan SPSS 16.0 for Windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas merupakan parameter utama yang banyak dilaporkan oleh para peneliti (Hafez & Hafez, 2000). Motilitas spermatozoa sapi Limousin setelah *thawing* (PTM) pada penelitian ini adalah 44.5% sampai dengan 48.33%. Viabilitas dari keempat pejantan mempunyai nilai yang masih cukup baik, yaitu berkisar antara 60.45% sampai dengan 64.80%. Integritas membran plasma adalah suatu keadaan yang menunjukkan fungsi fisiologis membran yang terjaga sebagai kontrol terhadap transport air sehingga cairan diluar sel tidak dapat memasuki

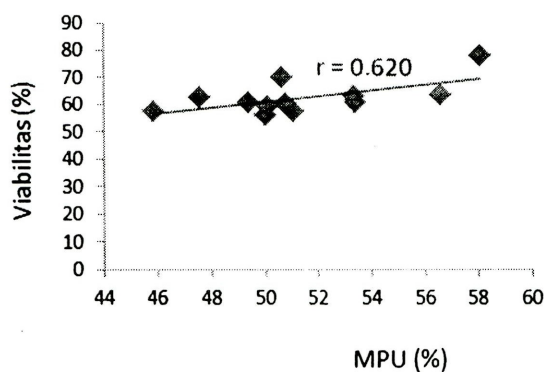
sel. Membran plasma utuh spermatozoa sapi Limousin pada penelitian ini masih cukup baik, yaitu antara 50.67% sampai dengan 52.67% (Tabel 1).

Tabel 1. Motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma sperma *post thawing* sapi Limousin (Rataan±SD)

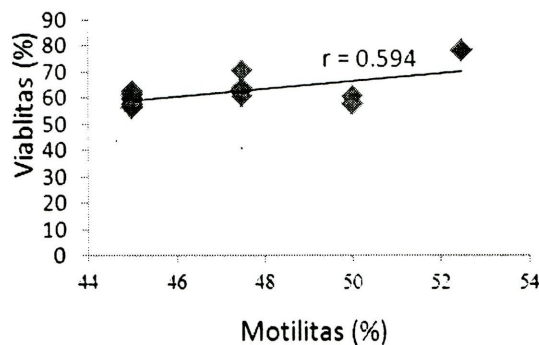
Parameter	Individu			
	Sapi 1	Sapi 2	Sapi 3	Sapi 4
Motilitas	47.5 ± 4.33	48.33±1.44	44.5 ±2.09	47.5 ±2.50
Viabilitas	64.03±12.23	64.80±4.97	60.45±0.74	61.24±3.12
MPU	51.30± 6.22	52.67±3.41	50.95±2.13	50.67±2.90

Hubungan Motilitas, Viabilitas, dan Membran Plasma Utuh

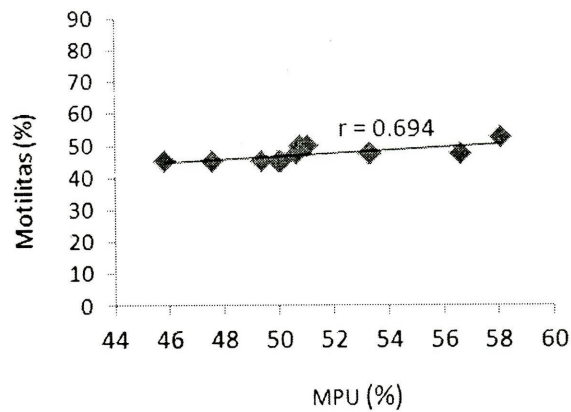
Hasil penelitian menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara motilitas dengan viabilitas ($r = 0.59$, $p = 0.04$), membran plasma utuh dengan viabilitas ($r = 0.62$, $p = 0.03$), dan membran plasma utuh dengan motilitas ($r = 0.69$, $p = 0.01$). Hal ini menunjukkan bahwa ketiga parameter tersebut berhubungan positif ($p < 0.05$), yaitu jika salah satu parameter tinggi, maka parameter lainnya juga akan tinggi. Begitu pula sebaliknya, jika salah satu parameter tersebut rendah, maka parameter yang lainnya juga akan rendah (Gambar 1, 2, dan 3).



Gambar 1. Hubungan antara motilitas dan viabilitas spermatozoa *post thawing* sapi Limousin



Gambar 2. Hubungan antara MPU dan viabilitas spermatozoa *post thawing* sapi Limousin



Gambar 3. Hubungan antara MPU dan motilitas spermatozoa *post thawing* sapi Limousin

Spermatozoa akan mengalami kerusakan pada saat pembekuan dan *thawing*. Hal ini terjadi karena adanya perubahan tekanan osmotik akibat adanya krioprotektan dalam bahan pengencer, perubahan suhu yang sangat ekstrim pada saat pembekuan dan juga saat di-*thawing* untuk diinseminasikan. Selama proses kriopreservasi, kerusakan membran terjadi di daerah akrosom spermatozoa (Blottner *et al.* 2001). Pendinginan yang terjadi pada proses pembuatan semen beku dan pemanasan kembali pada saat *thawing* akan merusak lipoprotein yang ada pada membran spermatozoa. Motilitas spermatozoa terjadi disebabkan oleh adanya kontraksi fibril-fibril yang ada pada bagian *principle piece* dan *end piece* dari ekor spermatozoa. Kontraksi ini terjadi jika ada perombakan Adenosin Tri Phosphat (ATP) menjadi Adenosin Di Phosphat (ADP) atau ADP menjadi Adenosin Mono Phosphat (AMP) pada bagian mitokondria yang terdapat dalam *mid piece* yang dimediasi oleh enzim aspartat amino transferase. Jika membran plasma bagian ekor rusak terutama pada bagian *mid piece* maka enzim ini akan hilang dan perombakan energi tidak terjadi sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya (Collenbrander *et al.* 1992). Hal ini dapat dikatakan motilitas merupakan indikator fungsi dari ekor spermatozoa.

Menurut Morrell dan Rodriguez-Martinez (2009), untuk dapat membuahi ovum, spermatozoa tidak hanya memiliki motilitas yang tinggi, tetapi harus normal secara morfologi, *viable*, dan mempunyai kromatin yang *intact*. Kerusakan spermatozoa dapat terjadi pada bagian ekor ataupun pada bagian kepala. Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian lain yang dapat memberikan indikator adanya kerusakan pada bagian kepala spermatozoa, di antaranya dengan melihat viabilitas dan melihat keutuhan membran plasma spermatozoa. Evaluasi viabilitas spermatozoa dengan pewarnaan eosin nigrosin digunakan untuk mengevaluasi kerusakan membran plasma, sedangkan HOS test digunakan untuk mengevaluasi aktivitas biokimia membran plasma (Brito *et al.* 2003). Komponen warna eosin akan masuk ke dalam sel yang mengalami kerusakan membran plasma dan membentuk warna merah muda keunguan, sedangkan nigrosin akan mewarnai latar bidang yang dievaluasi (Bjorndahl *et al.* 2004). Pada saat pencampuran spermatozoa dan eosin nigrosin, sel-sel spermatozoa yang hidup tidak atau sedikit sekali menyerap warna, sedangkan sel-sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna karena permeabilitas dinding sel meningkat (Hafez 2000).

Integritas membran plasma merupakan prasyarat bagi kelangsungan hidup spermatozoa (Sharma *et al.* 2012). Jika membran plasma sudah terganggu atau rusak maka akan mengakibatkan kondisi anisosmotik yang menjadi penyebab terjadinya kebocoran intraseluler diantaranya akan memengaruhi perombakan ATP sehingga memengaruhi motilitas spermatozoa (Bohlooli *et al.* 2012). Korelasi antara tiga parameter yang diuji merupakan

pembuktian adanya hubungan yang positif antara ketiga parameter tersebut, hal ini sesuai dengan laporan beberapa peneliti diantaranya Johnson *et al.* (2000) dan Kaeoket *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa membran plasma sel yang masih utuh akan memengaruhi organel-organel di dalam sel. Hal ini menyebabkan spermatozoa dapat bergerak progresif (motil) dan tetap hidup (*viable*) sehingga mampu melakukan fertilisasi (Kaeoket *et al.* 2011).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan terdapat hubungan yang positif antara motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma dari spermatozoa semen beku sapi Limousin. Pengujian pada viabilitas, motilitas dan MPU dari keempat sapi jantan menunjukkan hasil yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bohlooli S, Cedden F, Bozoglu S, Razzaghzadeh S, Pishjang J. 2012. Correlation between conventional sperm assay parameters in cryopreserved Ram Semen. *Ann. Biol. Res.* 3: 884-889.
- Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 65:75-88.
- Björndahl I, Söderlund I, Johansson S, Mohammadi M, Pourian MR, Kvist U. 2004. Why the WHO recommendation for eosin-Nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *J Androl* 25:671– 8.
- Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goessel S, Panich PL, Kastelic JP. 2003. Comparison of methods to evaluate plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in-vitro fertilization rate. *Theriogenology* 60: 1539-1551.
- Colenbrander, Fazeli AR, Van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM. 1992. Assesment of sperm cell membran integrity in the horse. *Acta. Vet.Scand. Suppl.* 88: 49-58.
- Hafez E.S.E and B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animal, 7th ed.* Lippincott Williams and Wilkins: South Carolina USA.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC, 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod. Scie.* 62: 143–172.
- Kaeoket K, Chanapiwat P, Tummaruk P, Techakumphu M, Kunavongkrit A. 2011. A preliminary study on using autologous and heterologous boar sperm supernatant from freezing processes as post-thawing solution: its effect o sperm motility. *Trop Anim Health Prod.* 43: 1049–1055.
- Morell JM, Rodriguz-Martinez H. 2009. Biomimetic Techniques for Improving Sperm Quality in Animal Breeding: A Review. *The Open Andrology J.* (1).
- Sharma M, Singh M, Kapoor S, Jasial S. 2012. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. *Open Vet. J.* 2: 26-31.
- Trantono Y. 2011. *Inseminasi buatan (BIB Lembang)*. [terhubung berkala] <http://yuari.wordpress.com> (2 Maret 2012).

**PROSIDING
SEMINAR NASIONAL**

**PERAN REPRODUKSI
DALAM PENYELAMATAN
& PENGEMBANGAN
PLASMA NUTFAH HEWAN
DI INDONESIA**

**GEDUNG SEAMEO BIOTROP, BOGOR JAWA BARAT
18-19 NOVEMBER 2013**



ASOSIASI REPRODUKSI HEWAN INDONESIA

@ 2014

©Asosiasi Reproduksi Hewan Indonesia (ARHI)

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang

Dilarang keras mengutip, menjiplak, memfotokopi atau memperbanyak dalam bentuk apapun, baik sebagian atau keseluruhan isi buku ini tanpa menyebutkan sumber.

Katalog Perpustakaan Nasional Indonesia

Prosiding Seminar Nasional : Peran Reproduksi dalam Penyelamatan dan Pengembangan Plasma Nutfah Hewan di Indonesia, 18 - 19 November 2013
Gedung Seameo-Biotrop, Bogor Jawa Barat

ISBN : 978-602-70559-0-2

Penyunting :

Herdis

Iis Arifiantini

M. Rizal Amin

Tuty L Yusuf

Dedi R. Setiadi

Santoso

Desain Cover oleh R. Taufiq Purna Nugraha

Dicetak Oleh CV. Sinar Jaya

Alamat Kontak :

Sekretariat Asosiasi Reproduksi Hewan Indonesia

d/a. Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi

Fakultas Kedokteran Hewan-Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat 16680

Telp:(0251)8623940 Faks:(0251) 8623940

Seminar Nasional PERAN REPRODUKSI DALAM PENYELAMATAN DAN PENGEMBANGAN PLASMA NUTFAH HEWAN DI INDONESIA

Gedung SEAMEO BIOTROP
Bogor, Jawa Barat 18 -19 November 2013

Diselenggarakan oleh



ASOSIASI REPRODUKSI HEWAN INDONESIA

Didukung oleh :



SEAMEO BIOTROP



Program Studi Biologi Reproduksi
Sekolah Pascasarjana



Direktorat Riset dan Inovasi
Institut Pertanian Bogor

DAFTAR ISI

No	Makalah Presentasi Oral	Halaman
1	Status Terkini Pengembangan Plasma Nutfah Ikan di Indonesia (Riani E)	1
2	Tingkat Kejadian Abnormalitas Spermatozoa Pejantan Sapi Bali pada Peternakan Rakyat di Sulawesi Selatan (AL Toleng, M Yusuf, DjP Rahardja dan Hasbi)	7
3	Kajian Kualitas Spermatozoa Epididimis <i>In Vitro</i> pada Sapi <i>Crossbreed</i> Dibandingkan dengan Sapi Peranakan Ongole (B Agung, EMN Setiawan dan A Rabiyyatul)	11
4	Daya Tahan Hidup Sperma Kucing Domestik (<i>Felis catus</i>) dalam Berbagai Bahan Pengencer pada Suhu 5°C (A Budiawan, RI Arifiantini dan BJ Widyananta)	15
5	Pemanfaatan Tris Sari Kedelai Sebagai Bahan Pengencer Semen Cair Kambing Peranakan Etawah (A Putra, RI Arifiantini dan M Noordin)	21
6	Performan Involusi Uteri dan Waktu Estrus Pasca Partus pada Berbagai Paritas Induk Sapi Perah Fries Holland (B Hadisutanto, B Purwantara dan S Darodjah)	26
7	Penerapan Manajemen Reproduksi untuk Peningkatan Produktivitas Rusa Timor (<i>Rusa timorensis</i>) di Penangkaran (D Samsudewa, ET Setiatin, YS Ondho dan Sutiyono)	30
8	Manajemen Reproduksi Ulat Sutera Liar <i>Attacus atlas</i> L. (Lepidoptera: Saturniidae) (DR Ekastuti)	35
9	Preservasi Imago Jantan Ulat Sutera Liar <i>Attacus atlas</i> (Lepidoptera: Saturniidae) pada Suhu 5°C dalam Rangka Preservasi Semen (EP Nugroho, DR Ekastuti dan RI Arifiantini)	41
10	Karakteristik Semen Segar Kelinci Lop dan Rex (I Maulidya, RI Arifiantini dan WMM Nalley)	45
11	Longivitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Friesian Holstein, Simmental, dan Brahman dalam Semen Beku Menggunakan Pengencer Skim (IT Kartika, RI Arifiantini, WMM Nalley dan E Rochmiati)	50
12	Dinamika Ovarium pada Sapi Potong (<i>Ovarian Dynamic In Beef Cattle</i>) (J Melia, A Sayuti, Amrozi dan M Agil)	56
13	Observasi Lama Siklus dan Periode Estrus pada Kuda (<i>Equus caballus</i>) (ED Kusmayanti, PH Siagian dan RI Arifiantini)	62

14	Nutrien Kolostrum sebagai Sumber Antibodi Alami untuk Transfer Pasif IgG dalam Mengantisipasi <i>Failure of Passive Transfer</i> (FPT) Pada Ternak Kuda yang Dipelihara secara Tradisional (LJM Rumokoy)	66
15	Hubungan Antara Morfometri Bobot Badan dan Produksi Telur Imago Betina Ulat Sutera Liar <i>Attacus atlas</i> (Lepidoptera : Saturniidae) (M Alex, RI Arifiantini dan DR Ekastuti)	69
16	Karakteristik Semen Ngengat <i>Attacus atlas</i> (Lepidoptera: Saturniidae) (M Rabusin, RI Arifiantini dan DR Ekastuti)	73
17	Tingkat Perkembangan Oosit Domba yang Dimaturasi dalam Media yang Ditambahkan dengan <i>2-Mercaptoethanol</i> Secara In Vitro. (OA Bintara, MA Setiadi dan NWK Karja)	79
18	Hubungan antara Viabilitas, Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Semen Beku Sapi Limousin (Rice S, RI Arifiantini dan T Susnawati)	83
19	Penggunaan Larutan Fisiologis Mamalia untuk Preservasi Semen Ulat Sutera Liar (<i>Attacus atlas</i>) (Lepodoptera: Saturniidae) (R Septiadi, DR Ekastuti dan RI Arifiantini)	88
20	Abnormalitas sperma Rusa Timor (<i>Cervus timorensis</i>) pada Tahap Ranggah Velvet dan Keras (R Handarini, WM Nalley, B Purwantara dan S Agungpriyono)	92
21	Korelasi Tingkat Abnormalitas Primer Spermatozoa Sapi-sapi Pejantan di beberapa Balai Inseminasi Buatan (BIB) dengan Fertilitas (M Riyadhi, RI Arifiantini dan Bambang P)	101
22	Penentuan Waktu Optimal Pengujian Keutuhan Membran Plasma Sperma Semen Beku Sapi Menggunakan <i>Hypo-Osmotic Swelling (HOS) Test</i> (RD Hardyana, RI Arifiantini dan D Utami)	105
23	Peranan Raffinosa kedalam Mempertahankan Kualitas Semen Beku Domba Garut (Santoso dan Herdis)	110
24	Respon Estrus Domba Lokal yang Diinduksi dengan Progesteron Dalam Spons Vagina (Soeparna, R Setiawan dan S Darodjah)	115
25	Evaluasi Kualitas Semen Cair Babi dalam Pengencer <i>Beltsvillethawing Solution</i> (Bts) yang Disimpan pada Temperatur Berbeda (NLG Sumardani, IP Arnaya dan IP Gede Bawa)	119
26	Penampilan Reproduksi Domba Betina Berdasarkan Tipe Kelahiran (Sutiyono, YS Ondho, S Johari dan Sutopo)	124
27	Gambaran Sitologi Ulas Vagina Kambing Peranakan Etawah Setelah Sinkronisasi Estrus (TL Yusuf, M Noordin, RI Arifiantini dan AF Bangkit) ...	129

28	Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Lama Melahirkan Anak Induk Sapi PO Hasil Perkawinan Inseminasi Buatan di Sulawesi Utara (U Paputungan, LR Ngangi dan HJ Kiroh)	133
----	--	-----

ABSTRACT

29	Diferensiasi Bm-Mscs Tikus Menjadi Sel Neurons, Osteocytes dan B-Langerhans <i>In Vitro</i> Menggunakan Condition Medium Spesifik (I Djuwita, IKM Adnyane dan WE Prasetyaningtyas)	137
30	Anestrus Postpartum Sapi Potong Rakyat dan Upaya Penanggulangannya dengan Metode Ovsynch di Provinsi Jambi (B Rosadi, T Sumarsono dan Darmawan)	138
31	Pengaruh Kadmium Terhadap Berat Testis dan Sel Leydig Mencit (<i>Mus musculus albinus</i>) (E Lisanti, A Winarto dan R Darmawan)	139
32	Efektivitas Antioksidan dalam Media Pemisahan Sperma Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (E Yuliani, HY Lukman dan YD Muksin)	140
33	Keberadaan Babi Betina Bersiklus dan Kontak Pejantan terhadap Gertak Pubertas Babi Dara (Rachmawati WS dan PE Hughes)	141
33	Pengaruh Level Gliserol dan Waktu Equilibrasi yang Berbeda terhadap Kualitas Spermatozoa Kerbau (Hendri, Z Udin dan Harpahmi)	143
Indeks Penulis		144