

Keefektifan Albumen sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y

Effectivity of Albumen as Separation Media for X and Y Chromosome-Bearing Bovine Spermatozoa

TAKDIR SAILI¹, MOZES R. TOELIHERE², ARIEF BOEDIONO³, DAN BAHARUDDIN TAPPA⁴

¹Program Studi Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

²Jurusan Reproduksi dan Kebidanan Ternak, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16151

³Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16151

⁴Laboratorium Genetika dan Reproduksi Ternak, Puslitbang Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong 16911

Diterima 30 Maret 2000/Disetujui 27 Juli 2000

Two combination of discontinuous albumen media were applied as separation media to evaluate whether albumen could be used effectively to change the natural ratio of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa. The first combination consisted of 10% and 30% albumen, whereas the second combination consisted of 10% and 50% albumen, respectively for top and bottom layer of column media. Washed semen was adjusted to a concentration of 150×10^6 spermatozoa/ml and 1 ml of the washed semen was then layered on the top of the media. After an hour of separation, each level of semen was washed using centrifugation method and separated spermatozoa was finally evaluated. Morphometric method and fluoroscopic observation were conducted to prove if the natural ratio of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa has changed. Results of the experiment revealed that the parameters related to viability of separated spermatozoa were lower although they were still acceptable for both *in vivo* and *in vitro* insemination. Therefore, the discontinuous levels of albumen media were found effective to change natural ratio of X and Y chromosome-bearing bovine spermatozoa.

PENDAHULUAN

Nisbah alamiah spermatozoa pembawa kromosom X dan Y umumnya sebanding. Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengubah nisbah tersebut untuk dapat mengendalikan jenis kelamin anak dari suatu kelahiran, baik pada ternak maupun manusia. Salah satu metode pemisahan spermatozoa berdasarkan perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y yang telah dianggap cukup valid ialah metode kolom albumin (Hafez 1987).

Keberhasilan penggunaan *bovine serum albumin* (BSA) dan ovalbumin sebagai media pemisahan spermatozoa diawali oleh Ericsson *et al.* (1973). Metode pemisahan dua atau tiga tahap dengan konsentrasi yang semakin meningkat lebih efektif dari pemisahan yang dilakukan satu tahap dengan berbagai konsentrasi BSA.

Pada penelitian ini telah dicoba penggunaan putih telur (albumen) sebagai media pemisahan spermatozoa sapi untuk menggantikan BSA. Penggunaan istilah albumen untuk menyebut putih telur secara umum tanpa membedakan bagian-bagian dari putih telur tersebut, termasuk ovalbumin (Regenstein 1984).

Penelitian ini bertujuan mengetahui viabilitas spermatozoa sapi yang telah mengalami proses pemisahan dengan menggunakan media albumen dan menguji keefektifan media albumen dalam mengubah nisbah alamiah spermatozoa sapi. Hasil penelitian ini diharapkan akan bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan wawasan dalam bidang reproduksi ternak, khususnya teknologi pemisahan spermatozoa pada sapi. Selain itu, penerapan teknologi ini pada tingkat lapangan (peternak) akan membawa dampak positif terhadap upaya pengendalian jenis kelamin ternak yang pada gilirannya akan meningkatkan efisiensi reproduksi ternak.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Media. Dalam penelitian pendahuluan telah dicoba beberapa kombinasi konsentrasi media albumen (albumen dilarutkan dalam media Brackett-Oliphant, BO). Dari berbagai kombinasi konsentrasi dipilih dua kombinasi konsentrasi yang dapat memenuhi syarat awal untuk melakukan pemisahan spermatozoa sapi. Syarat yang dimaksud ialah viabilitas dan konsentrasi spermatozoa setelah pemisahan masih memenuhi kriteria untuk tujuan inseminasi. Kombinasi media pertama ialah albumen yang dilarutkan dalam media Brackett-Oliphant (BO) dengan konsentrasi 10% (v/v) pada lapisan atas (A30) dan 30% (v/v)

* Penulis untuk korespondensi, E-mail: takdir69@hotmail.com

lapisan bawah (B30), sedangkan kelompok media kedua ialah albumen yang dilarutkan dalam BO dengan konsentrasi 10% (v/v) pada lapisan atas (A50) dan 50% (v/v) pada lapisan bawah (B50).

Penyiapan dan Pemisahan Spermatozoa. Semen sapi diperoleh secara teratur dari seekor sapi jantan Frisian Holland (FH). Untuk mengetahui kelayakan penggunaan semen tersebut dalam proses pemisahan dilakukan evaluasi secara makroskopis maupun mikroskopis. Contoh semen yang layak dicuci dengan metode sentrifugasi, kemudian diambil sebanyak satu mililiter (konsentrasi $150 \times 10^6/\text{ml}$) dan dimasukkan ke dalam tabung pemisahan. Satu jam kemudian setiap fraksi semen disedot dan dicuci dengan mengikuti prosedur sebelumnya dan dievaluasi untuk mengetahui perubahan konsentrasi dan viabilitasnya.

Penghitungan Konsentrasi dan Persentase Motilitas Spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan haemositometer. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 100x dengan menghitung jumlah spermatozoa yang berada pada lima kotak teracak di dalam kamar hitung haemositometer. Untuk menduga konsentrasi spermatozoa yang sebenarnya digunakan rumus Garner & Hafez 1987:

$$KS = Sh \times FM \times P$$

dengan: KS = konsentrasi spermatozoa, Sh = jumlah spermatozoa yang terhitung pada haemositometer, FM = faktor multiplikasi, P = pengenceran.

Untuk mengetahui persentase motilitas spermatozoa sapi digunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Penilaian yang diberikan mulai dari 0% (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai 100% (semua spermatozoa bergerak ke depan).

Persentase Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa. Contoh semen dimasukkan ke dalam larutan hipo-osmotik 0.032 M NaCl, kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar. Evaluasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400x, sedangkan jumlah minimum contoh spermatozoa yang diamati ialah 100 spermatozoa.

Pengukuran Spermatozoa secara Morfometrik. Pengukuran spermatozoa dilakukan dengan cara membuat preparat ulas terlebih dahulu. Selanjutnya, pengukuran panjang dan bagian terlebar kepala spermatozoa dilakukan dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000x dengan menggunakan mikrometer. Jumlah spermatozoa yang dihitung dari masing-masing fraksi ialah 200 spermatozoa. Untuk mengetahui luas kepala spermatozoa digunakan rumus yang dihasilkan dari data yang diperoleh dengan menerapkan metode integral dan regresi.

$$LKS = \{0.8988 \times P \times L\} - 1.63$$

dengan: LKS = luas kepala spermatozoa, 0.8988 = faktor koreksi, 1.63 = nilai konstanta, P = panjang kepala spermatozoa, L = bagian terlebar kepala spermatozoa.

Pengamatan Spermatozoa pada Mikroskop Fluoresens. Contoh semen dibuat dalam sediaan preparat ulas sebelum dilakukan pengamatan dengan mikroskop fluoresens. Zat warna yang digunakan dalam pembuatan preparat ulas ini ialah eosin-nigrosin. Pengamatan dilakukan terhadap spermatozoa yang memantulkan secara penuh cahaya fluoresens dan yang memantulkan sebagian atau tidak sama sekali. Spermatozoa yang memantulkan cahaya fluoresens secara penuh diduga sebagai spermatozoa yang membawa kromosom X, sedangkan yang kurang atau tidak sama sekali memantulkan cahaya fluoresens diduga sebagai spermatozoa yang membawa kromosom Y. Jumlah spermatozoa yang dihitung dari masing-masing contoh kurang lebih 100 spermatozoa.

Analisis Data. Data yang mencakup sifat makroskopis dan mikroskopis semen, baik sebelum maupun sesudah pemisahan, dikumpulkan dan masing-masing disajikan dalam bentuk rataan. Untuk mengetahui keefektifan metode pemisahan yang digunakan, data ukuran morfometrik dan fluoroskopik diuji dengan khi-kuadrat.

HASIL

Evaluasi Semen Sapi Segar. Beberapa peubah yang ada saling terkait satu sama lain (Tabel 1). Jika motilitas tinggi dan gerakan massa mempunyai nilai positif ++ atau +++ maka nilai integritas membran spermatozoa akan tinggi pula.

Evaluasi Spermatozoa setelah Pemisahan. Konsentrasi spermatozoa pada awal pemisahan sebanyak $150 \times 10^6/\text{ml}$, namun setelah pemisahan spermatozoa tersebut terbagi dalam dua lapisan media yaitu atas (A30 atau A50) dan bawah (B30 atau B50) (Tabel 2). Konsentrasi spermatozoa pada bagian bawah media lebih kecil dibandingkan konsentrasi pada lapisan atas. Semakin tinggi konsentrasi albumen pada lapisan bawah media maka semakin kecil konsentrasi spermatozoa yang terdapat pada lapisan itu. Demikian pula halnya dengan nilai persentase motilitas dan persentase membran plasma utuh.

Evaluasi Spermatozoa secara Morfometrik. Spermatozoa dengan ukuran kepala lebih kecil dari rata-rata ukuran kepala spermatozoa pada masing-masing kontrol digolongkan spermatozoa yang membawa kromosom Y,

Tabel 1. Rataan hasil evaluasi semen sapi segar secara makroskopis dan mikroskopis.

Peubah	Keterangan
Volume (ml/ ejakulat)	6.30 ± 0.48
Warna	Putih - krem
Konsistensi	Agak kental - kental
pH	6.41 ± 0.22
Gerakan massa	++(+)
Konsentrasi (juta/ml)	965.5 ± 69.0
Persentase motilitas (%)	77.0 ± 4.8
Persentase membran plasma utuh (%)	83.1 ± 2.3

Tabel 2. Rataan hasil pengukuran konsentrasi dan viabilitas spermatozoa sapi sebelum dan setelah pemisahan.

Peubah	Konsentrasi (juta/ml)	Motilitas (%)	MPU (%)
S0	965.50 ± 69.02	77.00 ± 4.83	83.13 ± 2.31
S1	706.00 ± 47.19	75.00 ± 5.27	80.93 ± 2.57
A30	86.25 ± 4.57	64.50 ± 4.83	74.51 ± 2.86
B30	12.77 ± 1.13	51.00 ± 2.11	58.94 ± 3.73
A50	89.75 ± 5.32	63.00 ± 4.22	71.72 ± 2.31
B50	9.05 ± 0.86	50.50 ± 1.58	58.02 ± 3.29

S0 = semen segar (kontrol); S1 = semen setelah disentrifus; A30 = semen fraksi atas dengan kombinasi konsentrasi albumen 10/30%; B30 = semen fraksi bawah dengan kombinasi konsentrasi albumen 10/30%; A50 = semen fraksi atas dengan kombinasi konsentrasi albumen 10/50%; B50 = semen fraksi bawah dengan kombinasi konsentrasi albumen 10/50%; MPU: Membran plasma utuh.

sedangkan yang lebih besar digolongkan spermatozoa yang membawa kromosom X. Hasil pengukuran kepala spermatozoa menunjukkan bahwa spermatozoa pada B50 mempunyai nilai rata-rata luas kepala yang terkecil ($36.80 \pm 4.27 \mu\text{m}^2$). Hal ini berarti spermatozoa pada B50 didominasi oleh spermatozoa yang membawa kromosom Y (Tabel 3).

Evaluasi Spermatozoa dengan Mikroskop Fluoresens. Hasil yang diperoleh pada pengamatan sinar fluoresens ini sejalan dengan hasil evaluasi spermatozoa secara morfometrik dengan nilai persentase spermatozoa Y tertinggi 72.64% diperoleh pada B50 (Tabel 4).

PEMBAHASAN

Evaluasi Semen Sapi Segar. Berdasarkan hasil evaluasi terhadap semen sapi segar dapat dikatakan bahwa kuantitas dan kualitas semen sapi yang digunakan pada penelitian ini baik karena masih berada pada kisaran kualitas spermatozoa yang normal seperti yang dilaporkan oleh Toelihere (1985) dan Garner & Hafez (1987) sehingga tidak ada keraguan untuk menggunakannya dalam proses pemisahan spermatozoa. Kuantitas dan kualitas semen yang baik dari sapi pejantan yang digunakan pada penelitian ini karena kuantitas dan kualitas makanan yang baik, umur dan bobot tubuh, serta sanitasi kandang yang baik.

Tabel 3. Rataan hasil pengukuran kepala spermatozoa sapi.

Peubah	Jumlah spermatozoa	Rata-rata ± SD (µm)			Spermatozoa (%)	
		Panjang Kepala	Lebar Kepala	Luas Kepala	X	Y
S0	200	9.64 ± 0.35	4.73 ± 0.29	39.30 ± 3.59	50.50	49.5
S0-30	150	9.50 ± 0.44	4.84 ± 0.32	39.56 ± 3.62	51.33	48.67
A30	200	9.80 ± 0.30	4.87 ± 0.24	41.10 ± 2.90	73.00	27.00
B30	200	9.33 ± 0.42	4.63 ± 0.42	37.23 ± 4.36	28.50	71.5
S0-50	150	9.54 ± 0.44	4.84 ± 0.31	39.75 ± 3.51	50.66	49.34
A50	200	9.68 ± 0.40	4.92 ± 0.20	40.97 ± 2.76	71.50	29.00
B50	200	9.43 ± 0.39	4.53 ± 0.39	36.80 ± 4.27	26.50	73.5

Simbol yang ada pada tabel ini sama dengan pada Tabel 2; S0-30 = semen kontrol untuk kombinasi konsentrasi albumen 10/30%; S0-50 = semen kontrol untuk kombinasi konsentrasi albumen 10/50%.

Evaluasi Spermatozoa setelah Pemisahan. Konsentrasi spermatozoa pada saat pemisahan $150 \times 10^6/\text{ml}$. Setelah proses pemisahan spermatozoa akan terpisah ke dalam dua fraksi yang berbeda (atas dan bawah). Konsentrasi spermatozoa mengalami penurunan setelah proses pemisahan seperti yang ditunjukkan oleh data pada Tabel 2. Penurunan ini diduga terjadi pada saat proses pencucian karena dimana spermatozoa yang telah terikat ke dalam media akan ikut tercuci.

Penurunan nilai persentase membran plasma utuh diduga terjadi bertahap yaitu pada proses sentrifugasi dan pada proses pemisahan. Kerusakan membran plasma spermatozoa pada proses sentrifugasi mungkin lebih disebabkan oleh faktor fisik, sedangkan kerusakan membran plasma spermatozoa pada proses pemisahan lebih disebabkan oleh faktor kimiawi. Dow & Bavister (1989) melaporkan bahwa serum albumin mempunyai peranan yang penting dalam proses penghilangan kolesterol dan ion zink yang berfungsi menstabilkan membran plasma spermatozoa. Hal ini disebabkan karena protein tersebut mempunyai kemampuan yang kuat untuk mengikat kolesterol dan ion zink. Albumen yang terdapat pada media pemisahan dengan konsentrasi yang berbeda pada setiap fraksi diduga memainkan peranan yang sama dengan serum albumin. Tingkat kerusakan membran plasma yang lebih kecil pada fraksi atas dibandingkan fraksi bawah dapat mendukung pernyataan tersebut karena konsentrasi albumen pada bagian atas lebih kecil dibandingkan bagian bawah.

Penurunan nilai persentase motilitas ini karena spermatozoa telah mengalami serangkaian perlakuan mulai proses pencucian hingga proses pemisahan yang membutuhkan banyak energi untuk tetap menormalkan kondisi fisiologinya. Proses pencucian yang berakibat pada pengurangan konsentrasi plasma semen dan menggantinya dengan media BO mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan menurunnya nilai motilitas spermatozoa bila dihubungkan dengan ketersediaan sumber energi bagi spermatozoa, walaupun di dalam media BO itu sendiri terdapat glukosa. Harrison *et al.* (1978) melaporkan bahwa motilitas spermatozoa akan menurun jika plasma semennya

Tabel 4. Rataan jumlah spermatozoa yang diduga membawa kromosom X atau Y dengan menggunakan mikroskop fluoresens.

Peubah	Jumlah spermatozoa pada								Spermatozoa (%)	
	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3		Total			
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
S0	50	55	57	54	56	55	163	164	49.81*	50.19*
A30	60	24	62	22	58	26	180	72	71.43*	28.57*
B30	20	58	26	54	22	56	68	168	28.78*	71.22*
A50	62	26	64	26	56	24	182	76	70.52*	29.48*
B50	20	52	18	48	20	54	58	154	27.36*	72.64*

Simbol yang ada pada tabel ini sama dengan pada Tabel 2; Huruf yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.01$) berdasarkan uji khi-kuadrat.

diganti dengan media utama yang mengandung 20 mM-*N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid*, 10 mM-glukosa, 2 mM- Na_2HPO_4 , 4 mM- MgCl_2 , 2.5 mM-KOH, 100 $\mu\text{g/ml}$ kanamisin sulfat dan dikondisikan pada pH 7.50 sampai 7.55 dengan NaOH. Selain itu kerusakan membran plasma akan berpengaruh langsung terhadap ketersediaan sumber energi bagi pergerakan spermatozoa.

Evaluasi Spermatozoa secara Morfometrik. Hasil uji khi-kuadrat menyimpulkan bahwa baik media dengan kombinasi konsentrasi albumen 10% dan 30% maupun media dengan kombinasi konsentrasi albumen 10% dan 50% mampu mengubah nisbah alamiah (kontrol) spermatozoa sapi secara nyata. Fraksi semen dengan konsentrasi spermatozoa Y yang tertinggi terdapat pada B50 dengan nilai 72.64%. Hal ini dimungkinkan karena tingginya konsentrasi albumen yang terdapat pada B50 menyebabkan hanya spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi saja yang mampu menembusnya. Goodall & Roberts (1976) melaporkan bahwa spermatozoa Y lebih motil dibandingkan spermatozoa X. Selain itu, Ke-hui & Matthews (1993) mengemukakan bahwa spermatozoa X lebih besar dibandingkan spermatozoa Y. Dengan adanya perbedaan ini dapat diperkirakan bahwa bobot dan kecepatan gerakanya juga akan berbeda.

Evaluasi Spermatozoa dengan Mikroskop Fluoresens. Pengamatan dengan mikroskop fluoresens menunjukkan adanya perbedaan intensitas cahaya yang dipantulkan di antara spermatozoa dalam suatu pengamatan. Spermatozoa yang dapat memantulkan cahaya fluoresens dengan baik diduga sebagai spermatozoa X, sedangkan yang tidak memantulkan dengan baik diduga sebagai spermatozoa Y. Hal ini dimungkinkan karena luas kepala spermatozoa X lebih besar dibandingkan Y (Ericsson & Glass 1982; Ke-hui & Matthews 1993) yang berkorelasi positif dengan massa DNA (Sumner & Robinson 1976; Kaneko *et al.* 1983). Potensi ini diduga akan menyebabkan perbedaan tingkat

penyerapan zat warna yang pada gilirannya akan memantulkan sinar fluoresens dengan intensitas yang berbeda.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa media albumen cukup efektif sebagai media separasi dan spermatozoa hasil pemisahan masih memenuhi kriteria sebagai sumber gamet jantan untuk tujuan inseminasi, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Dow, M.P.D. & B.D. Bavister. 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation *in vitro*. *Gamete Res.* 23:171-180.
- Ericsson, R.J. & R.H. Glass. 1982. Functional differences between sperm bearing the X and Y chromosomes. hlm. 201-211. Di dalam R.P. Amann & G.E. Seidel, Jr. (ed.), *Prospects for Sexing Mammalian Sperm*. Colorado: Colorado Associated University Press.
- Ericsson, R.J., C.N. Langevin & M. Nishino. 1973. Isolation of fraction rich in human Y sperm. *Nature* 246:421-424.
- Garner, D.L. & E.S.E. Hafez. 1987. Spermatozoa and seminal plasma. hlm. 189-209. Di dalam: E.S.E., Hafez. (ed.), *Reproduction in Farm Animals*. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Goodall, H. & A.M. Roberts. 1976. Difference in motility of human X and Y bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 48:433-436.
- Hafez, E.S.E. 1987. *Reproduction in Farm Animals*. Ed. ke-5. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Harrison, R.A.P., H.M. Dott & G.C. Foster. 1978. Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple media. *J. Reprod. Fert.* 52:65-73.
- Kaneko, S., J. Yamaguchi, T. Kobayashi & R. Iizuka. 1983. Separation of human X and Y bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. *Fertil. Steril.* 40:661-665.
- Ke-hui, C. & C.D. Matthews. 1993. X larger than Y. *Nature* 366:117-118.
- Regenstein, J.M. 1984. *Food Protein Chemistry*. London: Academic Press, Inc.
- Sumner, A.T. & J.A. Robinson. 1976. A differences in dry mass between the heads of X and Y chromosome bearing human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 48:9-15.
- Toelihere, M.R. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.