

## PREPARASI SPERMATOZOA DOMBA GARUT DENGAN TEKNIK SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS PERCOLL

Heri Sujoko<sup>1</sup>, Arief Boediono<sup>2</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian Universitas Palangka Raya

<sup>2</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi;

<sup>3</sup>Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

**Kata kunci :** Penyiapan spermatozoa, sentrifugasi, percoll

### Pendahuluan

Salah satu teknologi reproduksi berbantuan yang sering dilakukan adalah fertilisasi in vitro (*in vitro fertilisation/IVF*) (Andrabi & Maxwell 2007). Keberhasilan IVF salah satunya ditentukan oleh spermatozoa yang berkualitas (Morrell 2006). Teknik sentrifugasi gradien densitas percoll merupakan salah satu teknik penyiapan spermatozoa untuk IVF yang telah lama dikenal (Tucker & Jansen 2002). Prinsip dasar teknik ini adalah memisahkan spermatozoa motil dengan morfologi normal dari total populasi spermatozoa dalam medium gradien densitas percoll dan mengendapkan atau memisahkan spermatozoa dengan alat sentrifugasi (Samardzija *et al.* 2006). Tujuan penelitian ini adalah menentukan kombinasi kecepatan dan waktu sentrifugasi yang optimum untuk mendapatkan kualitas spermatozoa maksimal dengan tingkat kematian/kerusakan terendah.

### Bahan dan Metode

Sampel penelitian yang digunakan adalah semen segar domba Garut yang mempunyai kualitas baik dengan konsentrasi tiap perlakuan 200 juta sel/ml. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial, terdiri dari 16 kelompok perlakuan yaitu sentrifugasi pada (kecepatan dan waktu) \* (1) 200 xg 5 menit ; (2) 200 xg 10 menit ; (3) 200 xg 15 menit ; (4) 200 xg 20 menit ; (5) 300 xg 5 menit ; (6) 300 xg 10 menit ; (7) 300 xg 15 menit ; (8) 300 xg 20 menit ; (9) 400 xg 5 menit ; (10) 400 xg 10 menit ; (11) 400 xg 15 menit , (12) 400 xg 20 menit ; (13) 500 xg 5 menit ; (14) 500 xg 10 menit ; (15) 500 xg 15 menit dan (16) 500 xg 20 menit, masing-masing perlakuan diulang 3 kali.

Percoll dengan konsentrasi 10%, 50% dan 90% dimasukkan ke dalam sebuah tabung reaksi ukuran 15 ml mulai konsentrasi 90%

(paling bawah), 50% dan 10% (paling atas) masing-masing 2 ml. Sebanyak 400 µl semen diencerkan dengan medium BO hingga konsentrasi menjadi 200 juta sel/ml kemudian 1 ml semen diteteskan di atas 3 gradien konsentrasi percoll dan disentrifugasi sesuai perlakuan. Endapan ditambahkan medium BO dan disentrifugasi pada kecepatan 200 xg 5 menit. Endapan spermatozoa yang terbentuk kemudian dilakukan evaluasi.

Variabel yang diamati adalah kualitas spermatozoa meliputi konsentrasi, spermatozoa hidup, motilitas progresif dan spermatozoa normal. Data dianalisis dengan software SPSS 15.0 for windows dengan pengujian ANOVA dan dilanjutkan dengan Uji Jarak Ganda Duncan pada taraf signifikansi 5%. Pengolahan data deskriptif histogram dan grafik menggunakan Microsoft Excel 2003.

### Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sentrifugasi nyata ( $p < 0.05$ ) menurunkan rata-rata kualitas spermatozoa semen segar. Penurunan kualitas tersebut disebabkan spermatozoa pada telah mengalami serangkaian pertakuan mulai proses pengenceran, pemisahan dan pencucian dengan sentrifugasi. Perlakuan-perlakuan tersebut menyebabkan spermatozoa banyak kehilangan energi akibat berkurangnya nutrisi yang tersedia. Energi tersebut dibutuhkan diantaranya untuk menunjang daya hidup dan motilitas spermatozoa. Jika spermatozoa banyak menggunakan energi sementara nutrisi yang tersedia kurang mencukupi maka pada gilirannya akan menurunkan daya hidup dan motilitas progresif. Sedangkan pada spermatozoa segar tidak dilakukan sentrifugasi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sentrifugasi gradien densitas percoll nyata ( $p < 0.05$ ) meningkatkan konsentrasi spermatozoa, spermatozoa hidup, motilitas

progresif dan spermatozoa normal. Kecepatan sentrifugasi 400 xg 15 menit merupakan kombinasi yang optimum dan nyata ( $p < 0.05$ ) diperoleh rata-rata spermatozoa hidup tertinggi (74.82%), rata-rata spermatozoa motil progresif tertinggi (57.56%) dan rata-rata spermatozoa normal tertinggi (86%). Namun rata-rata konsentrasi spermatozoa tertinggi diperoleh pada kecepatan 500 xg 20 menit (47.67%) lebih tinggi ( $p < 0.05$ ) dibanding rata-rata konsentrasi yang diperoleh pada kecepatan 400 xg 15 menit (33.33%). Meningkatnya daya hidup ini bisa berkaitan dengan pisahnya spermatozoa dengan bakteri patogen atau jenis oksigen reaktif (Morrel 2006) selama sentrifugasi gradien percoll. Sedangkan meningkatnya motilitas progresif dan spermatozoa normal disebabkan spermatozoa yang memiliki motilitas progresif dan normal yang mampu bergerak ke lapisan percoll yang lebih pekat, sementara spermatozoa imotil tetap berada pada lapisan yang lebih encer, sehingga persentase spermatozoa yang berkualitas lebih banyak pada lapisan bawah. Adapun rata-rata kualitas spermatozoa hasil sentrifugasi percoll tertera pada Tabel 1, 2, 3 dan 4 berikut ini.

**Tabel 1**

Rata-rata Konsentrasi Spermatozoa (%)				
Kecepatan Sentrifugasi ( xg)	Waktu Sentrifugasi (menit)			
	5	10	15	20
200	12.33 <sup>b</sup>	21.67 <sup>b</sup>	26.67 <sup>c</sup>	32.33 <sup>d</sup>
300	19.00 <sup>a</sup>	25.33 <sup>b</sup>	30.67 <sup>c</sup>	39.00 <sup>d</sup>
400	24.33 <sup>a</sup>	27.67 <sup>ab</sup>	33.33 <sup>b</sup>	43.00 <sup>c</sup>
500	25.67 <sup>a</sup>	28.33 <sup>a</sup>	42.00 <sup>b</sup>	47.67 <sup>b</sup>

**Tabel 2**

Rata-rata Spermatozoa Hidup (%)				
Kecepatan Sentrifugasi ( xg)	Waktu Sentrifugasi (menit)			
	5	10	15	20
200	14.79 <sup>d</sup>	19.22 <sup>ab</sup>	24.98 <sup>b</sup>	17.2 <sup>ab</sup>
300	35.72 <sup>b</sup>	48.77 <sup>c</sup>	58.91 <sup>c</sup>	22.98 <sup>a</sup>
400	46.44 <sup>b</sup>	71.59 <sup>c</sup>	74.82 <sup>c</sup>	63.25 <sup>b</sup>
500	25.34 <sup>b</sup>	52.92 <sup>c</sup>	56.47 <sup>c</sup>	17.42 <sup>a</sup>

**Tabel 3**

Rata-rata Spermatozoa Motil Progresif (%)				
Kecepatan Sentrifugasi ( xg)	Waktu Sentrifugasi (menit)			
	5	10	15	20
200	15.00 <sup>a</sup>	24.34 <sup>ab</sup>	34.89 <sup>b</sup>	11.79 <sup>a</sup>
300	23.19 <sup>ac</sup>	44.54 <sup>b</sup>	48.04 <sup>b</sup>	15.51 <sup>a</sup>
400	48.48 <sup>b</sup>	51.28 <sup>b</sup>	57.56 <sup>b</sup>	34.16 <sup>a</sup>
500	25.67 <sup>b</sup>	34.46 <sup>c</sup>	37.01 <sup>c</sup>	11.46 <sup>a</sup>

**Tabel 4**

Rata-rata Spermatozoa Normal (%)				
Kecepatan Sentrifugasi ( xg)	Waktu Sentrifugasi (menit)			
	5	10	15	20
200	26 <sup>b</sup>	29 <sup>b</sup>	35 <sup>c</sup>	15 <sup>a</sup>
300	55 <sup>b</sup>	74 <sup>c</sup>	81 <sup>d</sup>	46 <sup>a</sup>
400	71 <sup>a</sup>	78 <sup>b</sup>	86 <sup>d</sup>	82 <sup>c</sup>
500	43 <sup>b</sup>	72 <sup>c</sup>	75 <sup>c</sup>	31 <sup>a</sup>

Keterangan Tabel 1, 2, 3 & 4 : Nilai dengan superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $p < 0.05$ ).

**Daftar Pustaka**

Andrabi SMH and Maxwell WMC. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. (Review). MC Franklin Laboratory, Faculty of Veterinary Science, The University of Sydney, Camden, NSW 2570, Australia. *Animal Reproduction Science* 99 : 223–243.

Morrell JM. 2006. Update on Semen Technologies for Animal Breeding. Nidacon International, Mo'ndalsva'gen, Gothenburg, Sweden. *Reprod Dom Anim* 41:63-67.

Samardzija M *et al*. 2006. The efficacy of gradient Percoll on bull sperm separation for in vitro fertilization. Clinic for Obstetrics and Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine. University of Zagreb, Zagreb Croatia. *Veterinarski Arhiv* 76:37-44.

Tucker KE, Jansen CAM. 2002. Sperm Separation Techniques: Comparison and Evaluation of Gradient Products. In: *Proceedings 2 International Workshop for Embryologists: Troubleshooting Activities In The ART Lab*. Ed. R. Basuray and D Mortimer