

Pemisahan Spermatozoa Sapi Limousin yang Memiliki Kromosom X dan Y dengan Percoll dan Putih Telur Ayam

(Separation of Bearing X and Y Chromosome Limosin Bull Spermatozoa by Using Percoll and Chicken Eggs Albumen)

Mahaputra L*, Maslichah Mafruchati*, NUSDianto Triakoso*, Rhandy Dwi Aries**

ABSTRACT

This research was one of the reproduction biotechnology method to solve the problem of spermatozoa separation bearing chromosome X and Y in Limosin bull. The aim of this research was to analysis of the effectiveness of Percoll and Albumen in Limosin bull chromosome X and Y separation and motility and living capacity of spermatozoa. These data were analysed using ANOVA F test with 30 straw spermatozoa in Limosin bull, 10 restarting in each other 1 control group (P0), (P1) using Percoll, and (P2) using Albumen. The result of this research showed that P0 have highest motility percentage and living capacity and significant difference with P1 as same as P2. However Albumen and percoll are effective to get the spermatozoa bearing X - chromosome.

Key words: sexing, spermatozoa bull, motility, semen quality

PENDAHULUAN

Agar dapat menghasilkan keturunan dengan jenis kelamin tertentu sesuai yang diinginkan peternak, dapat dilakukan pemisahan spermatozoa yang berkromosom seks X dan Y. Metode untuk memisahkan spermatozoa kromosom seks X dan Y, dikenal dengan metode sexing. Metode sexing, dapat dilakukan dengan berbagai macam cara dan bahan (Mahaputra dkk., 1989) telah memisahkan spermatozoa domba dengan menggunakan sephadex column G-200, dan didapatkan spermatozoa kromosom seks X dan Y dengan perbandingan 81,3% dan 18,7%. Syafei (1988) telah memisahkan spermatozoa manusia dengan jumlah spermatozoa kromosom seks Y kurang lebih 90,27% dengan larutan percoll Irawan (2000) telah memisahkan spermatozoa sapi madura dengan teknik sentrifugasi kolom percoll dua lapis dan tiga lapis, didapatkan spermatozoa kromosom seks X dan Y dengan perbandingan 63,192 5% dan 26,808% dengan perlakuan dua lapis percoll, serta 70,184 % dan 19,816% dengan perlakuan tiga lapis percoll.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan, pemisahan spermatozoa dengan medium percoll memiliki beberapa kelebihan jika dibandingkan dengan medium yang lain, di antaranya dapat dilakukan dengan mudah dan

cepat dengan viabilitas spermatozoa tetap tinggi, namun untuk menggunakan bahan ini diperlukan biaya yang agak besar. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan efektivitas pemisahan spermatozoa yang memiliki kromosom X & Y dengan menggunakan percoll dan putih telur berdasarkan ukuran kepalanya. Dalam penelitian ini memilih membandingkan percoll dan putih telur karena struktur antara keduanya hampir sama.

MATERI DAN METODE

Bahan dari penelitian ini adalah *straw* semen beku sapi *Limousin* produksi Teaching Farm Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Kedamean Gresik sebanyak 30 straw yang digunakan untuk kontrol, perlakuan Percoll dan Perlakuan Putih Telur. Bahan lain yang digunakan adalah kolom Percoll konsentrasi 45% dan 90%, Putih Telur konsentrasi 45% dan 90%, dan EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*), pewarnaan spermatozoa dengan menggunakan *Eosin Negrosin*.

Alat penelitian

Alat yang digunakan adalah dipersiapkan 24 jam sebelum dipakai, tabung reaksi, tabung sentrifus, objek glass, mikroskop Inverted (Olympus, Japan), mikroskop

* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

** Mahasiswa Pendidikan Dokter Hewan Universitas Airlangga

inverted (Meiji), vial, cone, mikrometer okuler (pembesaran 10×), inkubator CO₂ (Thermolyne, USA), pembakar bunsen, korek api, gunting, label nama, rak tabung, pipet skala 10–100 µl (Eppendorf Varipette 4710), pipet skala 10–1000 µl (Eppendorf Repeater 4780).

Perlakuan Penelitian

Prosedur kerja dari penelitian ini adalah sebagai berikut: 30 straw sapi Limosin dibagi untuk 3 kelompok perlakuan yaitu P0, P1, P2, dengan setiap perlakuan mendapat 10 ulangan. Penelitian ini dirancang menurut pola RAL. Perlakuan P0 (kontrol) yaitu 10 straw semen beku sapi *Limousin* kemudian 10 straw sapi *Limousin* dilakukan perlakuan menggunakan Percoll (P1) dan Putih Telur (P2) juga menggunakan 10 straw spermatozoa sapi *Limousin*.

Sebelum di campur dengan spermatozoa, percoll dan putih telur diencerkan terlebih dahulu hingga menjadi 45% dan 90%. Untuk membuat pengenceran percoll maupun putih telur 45%, ambil 2,25 ml percoll atau putih telur, masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan ke dalamnya 2,75 ml EBSS, setelah itu campur larutan tersebut hingga homogen, dengan menggunakan Vortex selama 1 menit. Untuk membuat pengenceran percoll maupun putih telur 90%, ambil 2,25 ml percoll atau putih telur, masukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan ke dalamnya 0,25 ml EBSS, setelah itu campur larutan tersebut hingga homogen, dengan menggunakan Vortex selama 1 menit.

Pada perlakuan kontrol (P0) 10 straw sapi *Limousin* setelah *dithawing* ditetaskan di atas 10 objek glass kemudian diamati motilitas, hidup mati, gan besar kepala spermatozoanya. Pada perlakuan P1, Sebanyak 3 ml percoll 90% diambil dengan pipet, kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifuge ukuran 15 ml yang steril, kemudian ditambahkan dengan 3 ml percoll 45% secara hati-hati di atas lapisan percoll 90%. Kolom percoll dengan dua konsentrasi berbeda (90% dan 45%), lalu diberi 3 tetes semen langsung dari straw selanjutnya di sentrifugasi pada kecepatan 850× g selama 10 menit. Selanjutnya ambil cairan dari dasar tabung untuk diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400×. Perlakuan P2, Tiga ml putih telur ayam 90% diambil dengan pipet, kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifuge ukuran 15 ml yang steril, disusul dengan 3 ml putih telur ayam 45% secara hati-hati di atas lapisan putih telur ayam 90%. Kolom albumin dengan dua konsentrasi berbeda (90% dan 45%) selanjutnya diberi 3 tetes semen langsung dari straw, dilanjutkan dengan sentrifugasi 850× g selama 10 menit. Selanjutnya ambil cairan dari dasar tabung untuk diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400×.

Penghitungan jumlah spermatozoa yang motil dilakukan dengan meneteskan mani beku yang terdapat dalam straw setelah proses thawing di atas gelas objek, kemudian diperiksa di bawah mikroskop (pembesaran 10 × 10). Penentuan presentase motilitas dilakukan dengan membandingkan spermatozoa yang bergerak dan yang tidak bergerak (Salisbury and Vandemark, 1985). Penghitungan dilakukan pada tiap 10 spermatozoa dalam satu lapang pandang kecil dan diulang pada lapang pandang yang lain sebanyak 3 kali. Sementara untuk membuat preparat ulas menggunakan zat warna eosin-negrosin. Penentuan spermatozoa berkromosom seks X dan Y di dasarkan atas ukuran kepala spermatozoa panjang kali lebar dengan ketentuan, spermatozoa yang berukuran lebih besar atau sama dengan rata-rata dikategorikan berkromosom seks X, sedangkan yang lebih kecil dari rata-rata dikategorikan berkromosom seks Y (Mahaputra dkk., 1989). Penghitungan persentase dilakukan pada tiap seratus spermatozoa yang diulang sepuluh kali tiap perlakuan. Pengamatan spermatozoa yang hidup, mati, serta pengukuran ukuran kepala spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop pembesaran 10 × 40.

Penelitian ini menggunakan metode Percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dilaksanakan dengan lima kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol (P0), Percoll 10 straw (P1), Putih Telur 10 straw (P2), dengan masing-masing 10 ulangan.

Data hasil penelitian disajikan dalam bentuk deskriptif berupa rata-rata persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup dan ukuran kepala spermatozoa berdasarkan panjang × lebar kepala. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan ANOVA uji F kemudian dilanjutkan *turkey* dengan taraf signifikan 5% untuk mengetahui adanya perbedaan yang nyata antara perlakuan.

HASIL DAN DISKUSI

Tabel 1. Rata-rata motilitas dan hidup straw spermatozoa sapi *Limousin*

Perlakuan	Ulangan	Rata-Rata Persentase Hidup (%) ± Standard Deviasi	Rata-Rata Persentase Motilitas (%) ± Standart Deviasi
P0	10	87,50 ^b ± 3,504	70,00 ^b ± 0,000
P1	10	45,70 ^a ± 5,458	49,00 ^a ± 8,756
P2	10	41,10 ^a ± 5,259	47,00 ^a ± 8,233

Notasi huruf a dan b pada kolom yang sama menunjukkan berbeda bermakna ($p < 0,05$).

Tabel 2. Rata-rata jumlah kromosom X spermatozoa sapi *Limousin* berdasarkan ukuran kepalanya

Perlakuan	Ulangan	Rata-Rata Kromosom X(%) ± Standart Deviasi
P0	10	54,00 ^a ± 7,789
P1	10	79,90 ^b ± 4,701
P2	10	78,30 ^b ± 4,001

Notasi huruf a dan b pada kolom yang sama menunjukkan berbeda bermakna ($p < 0,05$).

Berdasarkan analisis statistik dengan uji F terhadap motilitas spermatozoa sapi *Limousin* diperoleh F hitung > dari F tabel 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna (signifikan) di antara perlakuan ($p < 0,05$).

Penelitian ini menggunakan bahan berupa 10 buah straw mani beku sapi *Limousin* dengan tiga macam perlakuan yaitu kontrol, percoll (konsentrasi 45% dan 90%), dan putih telur (konsentrasi 45% dan 90%). Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat adanya perbedaan pada jumlah spermatozoa motil, jumlah mani hidup, serta jumlah spermatozoa kromosom seks X di antara ketiga perlakuan.

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan pada suhu kamar agar spermatozoa mempunyai pergerakan yang optimal. Terdapat tiga macam gerakan normal spermatozoa yaitu, gerakan maju, gerakan berputar, dan gerakan bergetar (**Hardijanto**, dkk., 1993). Metode yang dipergunakan untuk menilai motilitas spermatozoa biasanya dilakukan secara visual dan hasilnya dinyatakan secara perbandingan antara yang motil dan yang tidak motil (**Salisbury and Vandemark**, 1985). Penilaian motilitas spermatozoa dinyatakan dengan kisaran mulai 0–100%. Bila 80–100% nilai motilitasnya baik sekali, 60–80% motilitasnya baik, 40–60% cukup baik, 20–40% nilai motilitasnya jelek, 0–20% nilai motilitasnya sangat jelek. Batas minimum persentase motilitas spermatozoa sapi yang direkomendasikan untuk dilakukan perlakuan adalah $\geq 30\%$ (**Yelich**, 2008).

Hasil penelitian ini dapat memberikan gambaran bahwa mani beku sapi *limousin* yang digunakan memiliki kualitas cukup baik (spermatozoa motil sebesar $70\% \pm 0,000$) setelah thawing. Akan tetapi kualitas spermatozoa menunjukkan penurunan pada perlakuan percoll dan putih telur ($49,00\% \pm 8,756$ dan $47,00\% \pm 8,233$). Adanya perbedaan hasil (antara kontrol, dan setelah diberi perlakuan percoll dan putih telur) ini boleh jadi disebabkan oleh faktor waktu. Hasil ini membuktikan bahwa waktu salah satu faktor yang sangat memengaruhi motilitas spermatozoa. Penurunan kualitas ini bisa disebabkan oleh adanya

serangkaian proses yang mengkondisikan spermatozoa untuk diperlakukan sesuai dengan prosedur pemisahan kromosom seks X dan Y sehingga spermatozoa mengalami *shock* (**Sugiarti dkk.**, 2004).

Kualitas semen ditentukan juga oleh faktor besar kecilnya jumlah spermatozoa yang hidup, makin besar presentasi spermatozoa yang hidup, semakin baik pula kualitas semen tersebut. Penilaian persentase hidup mati spermatozoa dapat dilakukan secara mikroskopis setelah proses pewarnaan menggunakan zat warna *eosin – negrosin*. Prinsip penilaian ini didasarkan pada adanya zat warna yang dapat masuk ke dalam spermatozoa yang mati melalui bagian sel yang rusak atau bocor, ini terjadi akibat permeabilitas membran sel meningkat, terutama di daerah *post nuclear cups*, sehingga spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna menjadi merah keunguan, sementara spermatozoa yang hidup, karena membran selnya utuh, warnanya akan tetap putih jernih (**Hardijanto dan Hardjopranto**, 2008).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan presentasi hidup spermatozoa. Hal ini dapat dilihat di mana terdapat perbedaan yang nyata antara perlakuan kontrol ($87,50 \pm 3,504$) dengan perlakuan percoll ($45,70 \pm 5,458$) dan putih telur ($41,10 \pm 5,259$). Hal ini kemungkinan disebabkan oleh faktor waktu dan serangkaian proses, sehingga menyebabkan persediaan energi dari EBSS dan Albumin banyak yang terpakai mengakibatkan motilitas dan hidup spermatozoa menurun dan banyak yang mati. Menurut **Einarsson** (1992) bahwa proses *cooling*, *freezing* dan *thawing* sangat memengaruhi stabilitas dan fungsi-fungsi hidup sel membran. Penurunan kualitas spermatozoa di atas terjadi karena adanya kerusakan struktur membran akibat serangkaian proses dalam prosedur pemisahan kromosom seks X dan Y maupun selama pendinginan sehingga proses metabolisme spermatozoa terganggu (**Susilowati**, 2004).

Penentuan kromosom seks didasarkan atas ukuran kepala spermatozoa, jika dari 100 hitungan didapatkan spermatozoa dengan ukuran panjang dikalikan lebar ($p \times l$) $\geq$ dengan rata-rata maka diklasifikasikan kromosom seks X dan apabila lebih kecil dari rata-rata maka diklasifikasikan kromosom seks Y (**Mahaputra dan Mustofa** 2002).

Analisis kuantitatif rata-rata ukuran kepala spermatozoa sapi *limousin* pada kontrol adalah $54,00 \pm 7,789$. Ukuran kepala minimal diperoleh $35,28 \mu\text{m}$ sebanyak 13,1% dan untuk besar kepala maksimum adalah $49,61 \mu\text{m}$ sebanyak 7,7%, sedangkan sisanya adalah spermatozoa berkepala ukuran sedang antara $38,59$ – $44,1 \mu\text{m}$ sebanyak 79,2%. Jadi

ukuran kepala spermatozoa sapi *limosin* masih termasuk rentangan ukuran kepala sel spermatozoa umumnya bangsa sapi yaitu 32–45 μm (Hafez, 1993).

Prinsip dasar sentrifugasi adalah memisahkan dua zat atau lebih yang memiliki berat molekul berbeda, di mana zat yang memiliki berat molekul lebih berat akan berada pada lapisan bawah. Spermatozoa yang mempunyai berat lebih besar akan mampu menembus lapisan percoll tersebut lebih cepat. Spermatozoa berkromosom seks X memiliki kandungan DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) lebih banyak daripada spermatozoa berkromosom seks Y (Hafez, 1993). Oleh sebab itu apabila dilakukan sentrifugasi, spermatozoa berkromosom X cenderung lebih cepat membentuk endapan dibandingkan spermatozoa berkromosom seks Y (Mohri *et al.*, 1987). Faktor-faktor inilah yang menyebabkan mengapa pada perlakuan sentrifugasi dengan kolom percoll dalam penelitian ini memberikan hasil spermatozoa pada lapisan terbawahnya terbanyak berkromosom seks X.

SIMPULAN

1. Terdapat perbedaan persentase besar ukuran kepala spermatozoa antara spermatozoa kelompok kontrol dengan yang dipisahkan dengan menggunakan percoll dan putih telur.
2. Terdapat perbedaan persentase Motilitas dan Viabilitas spermatozoa antara kelompok kontrol dengan yang dipisahkan dengan menggunakan percoll dan putih telur.
3. Efektivitas percoll dan putih telur dalam memisahkan spermatozoa berkromosom seks X dan Y tidak berbeda nyata yaitu 79,9: 78,3%.

DAFTAR PUSTAKA

- Einarsson S, 1992. Concluding Remarks. In: Influence of Thawing Method on Motility, Plasma Membrane Integrity and Morphology of Frozen Stallion Spermatozoa.
- Hafez ESE, 1993. X- and Y- Chromosome-Bearing Spermatozoa. In Reproduction in Farm Animals. 6th. Ed. E.S.E. Hafez (editor). Lea & Febiger. Philadelphia. p: 440–445.
- Hardijanto T, Sardjito T, Hernawati S, Susilowati, dan TW Suprayogi, 1993. *Petunjuk Praktikum Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto dan Harjoprano S, 2008. *Diktat Kuliah Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Irawan D, 2000. *Pemisahan Spermatozoa Sapi Madura Kromosom seks X dan Y dengan Teknik Sentrifugasi Menggunakan Kolom Percoll*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mahaputra L, Wurlina, TD Sulistiyati, S Mulyati, 1989. *Pemisahan sel Spermatozoa Domba dengan sephadex Column G-200*. Media Kedokteran Hewan. 5(1): 31–38.
- Mahaputra L dan Mustofa I, 2002. *Pemisahan Sel Sperma Pembawa Kromosom Kelamin dan Perkembangan Embrio Hasil Fertilisasi in Vitro pada Sapi Madura*. Media Kedokteran Hewan. 18(1): 8–10.
- Mohri H, Oshio, S Kaneko, S Kobayashi and R Lizuka, 1987. *Separation and Charaterization of Mammalian X and Y Bearing Sperm New Horizon in Sperm Cell Research*. Mohri, H. Ed. Japan Sci. soc. Press Tokyo/Gordon and Breach Sci. pibl. New York. P: 496–481.
- Salisbury GW and NL Vandenmark, 1985. *Physiology of reproduction and Artificial Insemination of cattle*. Terjemahan oleh R. Djanuar, 1985.
- Sugiarti T, E Triwulanningsih, P Situmorang, rG Sianturidan DA, Kusumaningrum, 2004. *Penggunaan Katalase dalam Produksi Semen Dingin Sapi*. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4–5 Agustus 2004. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 215–220.
- Susilowati T, 2004. *Keberhasilan IB menggunakan semen sexing setelah dibekukan*. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4–5 Agustus 2004. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 195–206.
- Syafei S, 1988. *Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Memakai Percoll dalam Jamal A.A*, Pusat Penelitian Universitas Andalas Padang.
- Yelich J, 2008. *Fertility and Breeding Evaluation of Bulls* <http://florida.beef.cattle.short.course./dept.of.animal.science/gainesville.fl.pdf>. [29Maret 2009]