

Perbandingan Penghitungan Konsentrasi Spermatozoa Domba Merino dengan Metode Hemocytometer Thoma dan Spectrophotometer

Comparison of Hemocytometer Thoma And Spectrophotometer Method on Sperm Concentration Examination of Merino Sheep Semen

¹Trilas Sardjito, ²Wira Ramayadi, ²Pudji Srianoto, ²Chairul Anwar Nidom

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

Abstract

This research was conducted to determine differences concentration, the semen straw produced from the concentration, and research time of spermatozoa count method with hemocytometer thoma and spectrophotometer of merino sheep semen. One of microscopic examination of semen is calculating the concentration of spermatozoa. Calculating the concentration of spermatozoa is very important especially if the semen is processed into frozen semen. Both of these methods are excellent in calculating the concentration of spermatozoa. There are 10 merino sheep semen samples were calculated concentration of spermatozoa. Each sample of semen were counted directly by both methods. After concentration of spermatozoa has been counted, the amount of semen straw produced can be calculated. Statistical T-Test are use to compare the concentration, mini straw produced and research time from two methods. Results showed no significant differences in concentration and semen straw produced results from hemocytometer thoma and spectrophotometer methods, but the significant differences showed in research time from two methods.

Key words : Sperm Concentration, Hemocytometer, Spectrophotometer, Merino Sheep, Frozen Semen, Semen Straw.

Pendahuluan

Generasi pertama bioteknologi reproduksi peternakan di Indonesia adalah Inseminasi Buatan (IB). Teknologi ini sampai sekarang masih merupakan teknologi andalan bagi pemerintah untuk meningkatkan mutu genetik pada ternak terutama sapi perah, sapi potong, domba dan kambing. (Feradis, 2010)

Agar setiap dosis semen beku yang akan diinseminasikan ke ternak mengandung cukup spermatozoa untuk memberikan fertilitas atau kesuburan yang tinggi, maka harus dilakukan penilaian secara makroskopis dan mikroskopis terhadap semen hasil penampungan. Penilaian secara makroskopis diantaranya volume, konsistensi dan warna, sedang penilaian secara makroskopis diantaranya adalah konsentrasi. (Salisbury and Vandemark, 1985).

Konsentrasi spermatozoa sangat berpengaruh terhadap berapa banyak straw yang dapat dihasilkan dari semen yang ditampung. Terdapat beberapa metode yang digunakan untuk menghitung konsentrasi spermatozoa. Yaitu dengan metode memperkirakan jumlah konsentrasi spermatozoa dengan melihat kekentalan semen dan dengan metode menghitung spermatozoa secara langsung. Metode yang digunakan seharusnya dapat memberikan konsentrasi spermatozoa dengan akurat (Ennen *et al*, 1976).

Penemuan *Hemocytometer* menjadi suatu terobosan besar khususnya dalam bidang ilmu kedokteran. Alat ini sering kali disebut sebagai standar untuk menghitung konsentrasi sperma. Saat ini ada beberapa jenis dan desain dari hemositometer yang telah diciptakan, tetapi semua memiliki prinsip yang sama. Meskipun alat ini dianggap sebagai standar emas dalam

penghitungan konsentrasi spermatozoa, tetapi alat ini juga memiliki kekurangan antara lain adalah dalam hal penghitungan konsentrasi spermatozoa memerlukan waktu yang lebih lama. Hal ini disebabkan karena alat ini bekerja secara manual dan hasil penghitungan juga tergantung keterampilan dari operator (Christensen *et al*, 2005).

Seiring dengan berkembangnya teknologi khususnya dibidang kedokteran, maka diciptakan alat yang lebih efisien dan bekerja secara cepat dalam menganalisis spermatozoa. Alat ini dinamakan *Spectrophotometer*. Alat ini sangat penting dan harus ada di laboratorium, karena dapat menilai konsentrasi spermatozoa dengan cepat. Hasil penghitungan dalam bentuk cetak sehingga mudah untuk dibaca. Penggunaan alat ini dapat dikatakan mudah, karena dapat dipakai oleh siapa saja dan tidak memerlukan keterampilan khusus dalam menggunakannya (Hansen *et al*, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai konsentrasi spermatozoa domba serta membandingkan jumlah straw yang dihasilkan dan waktu penelitian menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer*.

Materi dan Metode Penelitian

Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah semen Domba Merino. Domba yang digunakan adalah satu ekor Domba Merino nama Bryan (20092) dalam keadaan sehat, dewasa kelamin, alat kelamin normal dan libido baik yang ada di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga, Gresik.

Pemeriksaan Konsentrasi

Hemocytometer kamar hitung *Thoma*

Langkah-langkah untuk pemeriksaan konsentrasi sebagai berikut, mula-mula semen dihisap memakai pipet eritrosit atau disebut *Hemocytometer* hingga angka 0.5. Kemudian ditambahkan pengencer berupa eosin sampai angka 101. Sehingga diperoleh besarnya pengencer : $100/0.5 = 200$ kali, karena cairan di dalam pipet sampai angka 1.0 tidak ikut bercampur. Ujung karet penghisap ditekuk dan pipet dikocok dengan gerakan membentuk angka delapan beberapa kali sampai larutan di dalamnya homogen. Selanjutnya sebelum dilakukan pemeriksaan, 2-4 tetes larutan dibuang untuk menghilangkan cairan dalam

pipet tadi yang tidak ikut tercampur. Larutan diatas ditetaskan di atas papan hitung *Thoma* melalui salah satu sisi gelas penutup. (Hardijanto dkk., 2010).

Papan hitung *Thoma* terdiri dari kotak yang panjangnya 1 mm, lebar dan dalamnya 0,1 mm, atau volumenya 0,1 mm³. dalam kotak ini ada 1 kotak besar yang masing-masing terbagi lagi menjadi 16 kotak kecil yang sama besarnya. Dalam pemeriksaan ini dihitung jumlah spermatozoa di dalam 5 kotak besar yang terdiri dari 4 kotak yang berdiagonal dan 1 kotak di sudut yang lain. jadi yang dihitung ada 5×16 kotak kecil = 80 kotak kecil. Dalam papan hitung *Thoma* seluruhnya mengandung 400 kotak kecil. Bila jumlah spermatozoa di dalam 80 kotak kecil = Y, jadi di dalam 400 kotak kecil mengandung $400/80 \times 200 \times Y$. Berarti di dalam 1 mm³ semen mengandung = $400/80 \times 200 \times 10 \times Y = 10000 Y$. (Susilowati dkk., 2010).

Menggunakan *Spectrophotometer*

Langkah-langkah dalam menggunakan *Spectrophotometer* adalah sebagai berikut, mula-mula kabel listrik *Spectrophotometer* ditancapkan pada sumber listrik. Tekan ON pada *Spectrophotometer* dan ditunggu selama 10 menit. Tabung kuvet diisi 4 ml NaCl fisiologis kemudian dimasukkan ke dalam lubang kuvet pada *Spectrophotometer*. Tanggal, bulan dan tahun dimasukkan kemudian ditekan. Identitas semen dimasukkan. Volume semen dimasukkan kemudian. Motilitas semen dimasukkan. Tabung kuvet diambil kemudian ditambahkan semen sebanyak 8 µl lalu diaduk satu arah secukupnya. Tabung kuvet dimasukkan kembali ke dalam lubang *Spectrophotometer* kemudian ditunggu. Akan terlihat di monitor hasil penghitungan tersebut kemudian ditekan OK untuk mencetak. Bila sudah selesai ditekan ESC beberapa kali sampai terdengar bunyi alarm. (Susilowati dkk., 2010).

Penghitungan Jumlah Straw

Dalam satu dosis straw memiliki volume 0,25 ml dengan konsentrasi spermatozoa domba sebanyak 125 juta. Dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* didapatkan konsentrasi spermatozoa. Untuk menghitung jumlah straw yang dihasilkan digunakan rumus :

$$\frac{\text{Volume (ml)} \times \text{Motilitas (\%)} \times \text{Konsentrasi Spermatozoa (Juta/ml)}}{125.000.000}$$

Analisis Data

Pada penelitian ini menggunakan Uji t dengan 2 perlakuan dan 10 kali pengulangan untuk membandingkan jumlah straw yang dihasilkan dengan metode *Hemocytometer* dengan menggunakan papan hitung *Thoma* dan metode *Spectrophotometer*.

Hasil dan Pembahasan

Hasil penelitian menggunakan Semen segar Domba Merino sebelum dilakukan pemeriksaan dengan metode *Hemocytometer* dan *Spectrophotometer* dilakukan pemeriksaan secara makroskopis yang dihasilkan rata-rata dan simpangan baku volume sebesar $1,20 \text{ ml} \pm 0,16$ dan pemeriksaan mikroskopis yang menghasilkan rata-rata dan simpangan baku motilitas sebesar $77\% \pm 16,36$

Tabel 1. Hasil rata-rata dan simpangan baku penghitungan konsentrasi spermatozoa domba Merino yang dihasilkan dengan menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer*.

Metode	Konsentrasi Spermatozoa Domba Merino (juta/ml)
<i>Hemocytometer</i>	$4.89^a \pm 1.04$
<i>Spectrophotometer</i>	$5.04^a \pm 0.93$

Keterangan : Superskrip yang sama di kolom yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p > 0,05$)

Analisis statistik dengan uji t terhadap penghitungan Konsentrasi Spermatozoa yang dihasilkan dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* diperoleh sebesar 0,342. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan Konsentrasi Spermatozoa setelah dilakukan penghitungan dengan kedua metode tersebut tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Sampel penelitian berupa semen segar dihitung konsentrasi spermatozoa terlebih dahulu dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer*, kemudian didapatkan jumlah straw yang dihasilkan dari kedua metode tersebut. Jumlah straw yang dihasilkan dari 10 sampel semen yang dihitung konsentrasi spermatozoa dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* diperoleh hasil rata-rata $38,00 \pm 15,99$ dan $39,20 \pm 16,30$ (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil rata-rata dan simpangan baku jumlah straw yang dihasilkan Domba Merino dengan menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer*.

Metode	Jumlah straw yang dihasilkan Domba Merino
<i>Hemocytometer</i>	$38,00^a \pm 15,99$
<i>Spectrophotometer</i>	$39,20^a \pm 16,30$

Keterangan : Superskrip yang sama di kolom yang sama menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p > 0,05$)

Analisis statistik dengan uji t terhadap jumlah straw yang dihasilkan dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* diperoleh sebesar 0,336. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan jumlah straw yang dihasilkan setelah dilakukan penghitungan konsentrasi spermatozoa dengan kedua metode tersebut tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Tabel 3. Hasil rata-rata dan simpangan baku penghitungan Waktu Penelitian yang dihasilkan dengan menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer*.

Metode	Waktu Penelitian (menit)
<i>Hemocytometer</i>	$28,40^a \pm 5,97$
<i>Spectrophotometer</i>	$10,70^b \pm 1,64$

Keterangan : Superskrip yang berbeda di kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Analisis statistik dengan uji t terhadap Waktu Penelitian dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* diperoleh sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan Waktu Penelitian yang dihasilkan setelah dilakukan penghitungan konsentrasi spermatozoa dengan kedua metode tersebut berbeda nyata ($p < 0,05$).

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa penghitungan konsentrasi spermatozoa dan perbedaan jumlah straw yang dihasilkan dengan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* tidak berbeda nyata, tapi data hasil penelitian akan waktu penggunaan alat yang dihasilkan metode *Hemocytometer*

dan *Spectrophotometer* berbeda nyata. Hasil penghitungan dari metode *Hemocytometer* ini sudah tidak dapat diragukan lagi. Metode *Spectrophotometer* merupakan metode yang lebih modern dan bisa dikatakan lebih canggih dari pada metode *Hemocytometer*. (Sokol *et al*, 2000).

Metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* sebenarnya sama-sama dapat menghitung konsentrasi spermatozoa dengan cara kerja yang berbeda. Oleh karena cara kerja yang berbeda, waktu pengerjaan juga pasti berbeda jika hasil yang tidak berbeda dalam jumlah konsentrasi maka jumlah straw yang dihasilkan juga tidak berbeda. Pada penelitian yang dilakukan oleh Paulenz *et al*. (1995) juga mendapatkan hasil yang tidak berbeda dalam jumlah konsentrasi spermatozoa yang dihitung baik itu dengan menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer*.

Kuster (2005) menyatakan bahwa melihat spermatozoa secara langsung dengan bantuan mikroskop dan menghitungnya dapat memperkuat hasil penghitungan konsentrasi spermatozoa dari semen tersebut. Itu karena petugas terlibat langsung dalam proses penghitungan.

Metode *Hemocytometer* dikatakan akurat dalam penghitungan konsentrasi spermatozoa karena menghitung spermatozoa satu-persatu dengan menggunakan mikroskop, Spermatozoa yang terdapat pada 5 kotak tersebut dihitung satu-persatu maka didapatkan hasil konsentrasi spermatozoa setiap mililiter (Knox *et al*, 2002).

Spectrophotometer terdiri dari dua bagian yaitu *Spectro* yang berfungsi memancarkan sinar dengan panjang gelombang tertentu dan *Photometer* yang berfungsi menangkap sinar yang melewati tabung kuvet. Dengan memancarkan sinar dengan berbagai panjang gelombang ke arah tabung kuvet, maka didapatkan panjang gelombang yang dapat menembus cairan tersebut. Sehingga jika didapatkan partikel atau zat lain yang memiliki panjang gelombang yang berbeda, maka sinar tersebut akan diserap dan yang dapat menembus akan diterima oleh reseptor. Banyaknya partikel atau zat lain tersebut sesuai dengan sinar yang diserap dan yang dapat menembus (Atiq *et al*. 2011).

Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilaporkan oleh Brillard dan McDaniel (1985) dan Donoghue *et al*. (1996). *Hemocytometer*

adalah alat yang dianggap standar untuk evaluasi konsentrasi sperma tetapi menghabiskan banyak waktu penelitian dan tidak dapat digunakan dalam evaluasi rutin semen sampel di laboratorium. Rata-rata waktu evaluasi yang diperiksa oleh metode *hemocytometer* lebih lama dibandingkan dengan metode *Spectrophotometer*

Kesimpulan

Penghitungan spermatozoa menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* terhadap konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan tidak berbeda nyata. Penghitungan konsentrasi spermatozoa menggunakan metode *Hemocytometer* dan metode *Spectrophotometer* terhadap jumlah straw yang dihasilkan tidak berbeda nyata. Waktu penelitian menggunakan metode *Spectrophotometer* lebih cepat dan berbeda nyata dari pada waktu penelitian menggunakan metode *Hemocytometer*.

Daftar Pustaka

- Atiq N., Ullah N., Andrabi S. M. H. and Akhter S. 2011. Comparison Of Photometer With Improved Neubauer Hemocytometer and Makler Counting Chamber For Sperm Concentration Measurement In Cattle. Pakistan Veteriner Journal. 31:83-84.
- Brillard, J.P. and McDaniel, G.R. 1985. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poult Sci*, 64: 155-158.
- Camus A., Camugli S., Leveque C., Schmitt E. and Staub C. 2011. Is Photometry An Accurate and Reliable Method To Assess Boar Semen Concentration? *Theriogenology*. 75:577-583.
- Christensen P., Stryhn H., Hansen C. 2005. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burkert-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 63:992-1003.
- Donoghue, A.M., Thistlethwaite, D., Donoghue, D.J and Kiby, J.D. 1996. A new method for rapid determination of sperm concentration in Turkey Semen. *Poult Sci*, 75:785-789.
- Ennen B.D., Berndston W.E., Mortimer R.G. and Pickett B.W. 1976. Effect of Processing Procedures on Motility of Bovine Spermatozoa Frozen in .25-ml

- Straws. J Anim Sci, 43:651-656.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung.
- Hansen C., Christensen P., Stryhn H. 2002. Validation of The FACSCount AF System for Determination of Sperm Concentration In Boar Semen. Reproduction Domestic Animal. 37: 330.
- Hardijanto., S. Trilas., H. Tatik., S. Suherni., S. Tri. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kuster C. 2005. Sperm Concentration Determination Between Hemacytometric and CASA System: Why They Can Be Different. Theriogenology. 64:614-617.
- Paulenz, H., I. S. Grevle, A. Tverdal, P. O. Hofmo, and K. Andersen Berg. 1995. Precision of the Coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. Reprod. Dom. Anim. 30:107-111.
- Salisbury, G.W. and N.L Vandemark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi (Physiology and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Januar, R. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Susilowati, S., Hardijanto, S. Tri, S. Trilas, H. Tatik., 2010. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Sokol R. Z., Shulman P., and Paulson R. J. 2000. Comparison Of Two Methods For The Measurement Of Sperm Concentration. Fertil Steril. 73:591-594.

