

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Morfologi Spermatozoa

Struktur morfologi spermatozoa sapi yang utama terdiri dari kepala dan ekor (bagian tengah/ *mid piece*, bagian utama/ *principal piece* dan bagian akhir/ *end piece*) yang diselubungi oleh membran plasma spermatozoa. Garner dan Hafez (2008) menyatakan bahwa panjang dan lebar kepala spermatozoa sapi 8,0 – 10,0  $\mu\text{m}$  x 4,0 – 4,5  $\mu\text{m}$ , dengan ketebalan kepala sekitar 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ . Bagian ekor mempunyai panjang 35 – 45  $\mu\text{m}$ , sedangkan *mid piece* spermatozoa memiliki panjang sekitar 1,5 – 2 kali panjang kepala.

Membran spermatozoa merupakan susunan yang sangat kompleks struktur molekul dan fungsinya. Strukturnya tersusun atas dua lapis fosfolipid, protein, glikoprotein dan karbohidrat (glikokaliks). Membran plasma spermatozoa tersusun atas rangkaian asam lemak tak jenuh ganda yang peka terhadap kerusakan peroksidasi dan dapat menyebabkan hilangnya integritas membran, penurunan motilitas spermatozoa dan infertilitas (Ulysal and Bucak, 2007).

Bagian utama kepala spermatozoa terdiri atas kromosom yang terdiri atas untaian DNA. Pada bagian kepala terdapat akrosom, merupakan struktur dengan dinding 2 lapis yang berada diantara membran plasma dan bagian anterior kepala spermatozoa. Pada bagian tudung akrosom terdapat enzim *hyaluronidase*, *akrosin* dan enzim hidrolitik lainnya yang berperan dalam proses fertilisasi dengan sel telur. Bagian equator pada kepala spermatozoa merupakan bagian penting dari spermatozoa yang akan berfusi dengan membran sel telur saat fertilisasi terjadi.

## 2.2. Kualitas Semen Sapi

Kualitas semen sapi jantan merupakan salah satu parameter penilaian fertilitas pada sapi jantan (*breeding soundness evaluation*), selain daripada lingkaran skrotum. Syarat seekor pejantan dapat digunakan sebagai sumber semen adalah konsentrasi spermatozoa minimal 500 juta/ml, motilitas progresif 50% dan persentase morfologi normal spermatozoa minimal 80%. Karakteristik spermatozoa antar hewan atau ternak berbeda-beda. Karakter semen pada sapi jantan diantaranya: volume 5-8 ml, motilitas 40-75%, konsentrasi 800-2000 juta/ml, spermatozoa normal mencapai 65-95% dan rentang PH 6,4-7,8 (Garner and Hafez, 2008).

Parameter kualitas semen yang paling utama pada *breeding soundness evaluation* adalah morfologi spermatozoa dan motilitas spermatozoa. Morfologi spermatozoa pada sapi secara garis besar terdiri atas kepala dan ekor. Kepala terdiri atas tudung akrosom dan post akrosom. Sedangkan bagian ekor terdiri atas leher, bagian tengah (*middle*), bagian pokok (*principal*) dan bagian akhir (*end*). Bentuk anomali dari morfologi spermatozoa disebut dengan abnormalitas spermatozoa. Ax, Dally, Didion, Lenz, Love, Varner, Hafez, Bellin (2008) mengategorikan abnormalitas spermatozoa menjadi 3, yaitu: primer, sekunder dan tersier. Abnormalitas primer dikaitkan dengan abnormalitas pada kepala dan akrosom. Abnormalitas sekunder dikaitkan dengan keberadaan droplet pada bagian tengah dan ekor. Sedangkan abnormalitas tersier dikaitkan dengan abnormalitas pada ekor spermatozoa.

Motilitas spermatozoa merupakan parameter penting dalam penilaian kualitas semen. Parameter motilitas spermatozoa meliputi beberapa kriteria, diantaranya: persentase spermatozoa motil progresif, dan jumlah total spermatozoa motil. Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan secara subyektif (*biased*) dan bersifat

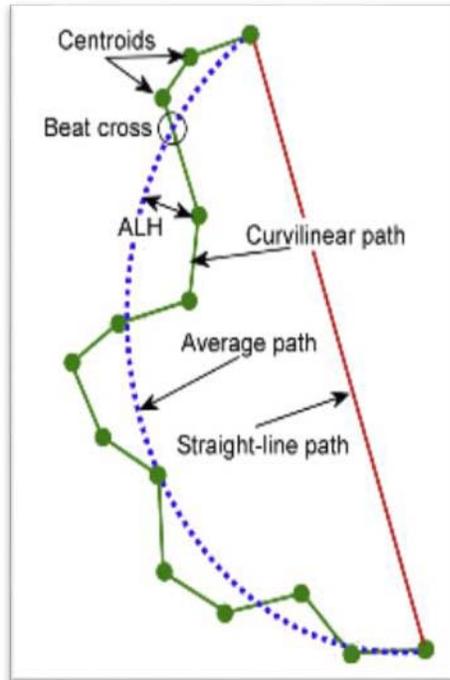
sangat peka terhadap perubahan lingkungan. Prosedur penilaian motilitas spermatozoa yang lebih obyektif (*unbiased*) diantaranya dengan *spektrofotometri*, *time-lapse-photomicrography*, *videomicrography* dan *computerized analysis (CASA)*.

### **2.3. Computerized Assisted Sperm Analyzer (CASA)**

*Computerized Assisted Sperm Analyzer* merupakan suatu metode analisa spermatozoa dengan mengoptimalkan perangkat computer. Mekanisme kerja CASA adalah melalui identifikasi pola gerakan kepala spermatozoa dan pola lintasan yang dilalui spermatozoa. Manfaat dan keunggulan CASA diantaranya: obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail. Namun demikian, ketepatan preparasi sampel dan pengaturan alat sangat menentukan validitas hasil analisa menggunakan CASA. Salah satu parameter yang dapat diukur dengan menggunakan CASA adalah motilitas spermatozoa. Beberapa parameter utama motilitas spermatozoa yang dapat diukur menggunakan CASA diantaranya: kecepatan spermatozoa/ *velocity (straight line, curvelinier)*, linearitas/ *linearity* dan ketahanan motilitas spermatozoa/ *longevity* pada suhu ruang (Garner and Hafez, 2008).

Sarastina, Susilawati dan Ciptadi (2006) menyatakan bahwa analisa motilitas spermatozoa dengan CASA dapat dilakukan secara detail sampai dengan level 3. Analisa motilitas spermatozoa level 1 meliputi motilitas dan motilitas progresif. Analisa motilitas spermatozoa level 2 meliputi: evaluasi status hiperaktif, *linear, non linear, curve linear*. Analisa motilitas spermatozoa level 3 meliputi: *distance curve-line (DCL)*, *distance average path (DAP)*, *distance straight line (DSL)*, *curvelinear velocity (VCL)*, *average path velocity (VAP)*, *straight-line velocity (VSL)*, *linearity*

(LIN), *straightness* (STR), *wobble* (WOB), *beat cross frequency* (BCF), *amplitude of lateral head displacement* (ALH), *Average Orientation Change of Head* (AOH).



**Gambar 1.** Lintasan Pergerakan Spermatozoa (Sumber : Amman *et al.*, 2014)

Beberapa definisi parameter motilitas yang terukur dengan menggunakan CASA diantaranya: *Distance Curve-line* (DCL) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve*. *Distance straight line* (DSL) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight*. *Distance average path* (DAP) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur. *Curvilinear velocity* (VCL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve*. *Straight-line velocity* (VSL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight*. *Average path velocity* (VAP) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur. *Average Orientation*

*Change of Head* (AOH) merupakan rata-rata derajat perubahan gerakan kepala spermatozoa (Sarastina dkk, 2006).

Standar parameter motilitas menggunakan CASA beragam berdasarkan literatur. Susilawati (2011) menyatakan untuk parameter motilitas level 1: non motil (AOC <5,0) dan lokal motil (DSL <4,5). Standar motilitas level 2: hiperaktif (VCL >80; LIN<0,65; ALH>6,5), linear (STR>0,5; LIN>0,35), non linear (STR=0,5; LIN<0,35) dan curve linear (DAP/Diameter=30; LIN<0,5). Shibahara, Obara, Kikuchi, Yamanaka, Hirano, Suzuki, Takamizawa, Suzuki (2003) dan Ripp, Mac Vittie, Minhas (2003) menyatakan jika spermatozoa dikatakan hiperaktif apabila mempunyai nilai VCL>100  $\mu\text{m/s}$  dan LIN >60 %. Motilitas spermatozoa >80 % diartikan bahwa rata-rata sel yang bergerak lebih dari 10  $\mu\text{m/s}$  lebih dari 80%. Kriteria motilitas progresif adalah spermatozoa bergerak lebih dari 20  $\mu\text{m}$  per detik. Motilitas progresif spermatozoa ditandai dengan VAP > 25  $\mu\text{m/s}$  dan STR > 80 %. Nilai VAP dan VCL merupakan prediksi yang baik untuk kemampuan fertilisasi spermatozoa secara in vitro. Nilai VCL, LIN, ALH berpengaruh terhadap kelompok spermatozoa yang mengalami hiperaktifasi. Nilai VAP, VSL, LIN berpengaruh terhadap motilitas progresif. Nilai VCL, ALH, BCF merupakan indikator *vigor* spermatozoa (Sarastina dkk, 2006).

#### **2.4. Semen Cair Sapi Potong**

Teknologi semen cair merupakan salah satu bentuk bioteknologi reproduksi yang mulai marak dilakukan dalam dunia peternakan. Semen cair merupakan pencampuran semen segar dengan pengencer tertentu dan disimpan pada suhu 5°C dengan daya simpan sampai dengan 10 hari pada konsentrasi 100 juta/ml (Situmorang, 2003). Keuntungan teknologi semen cair yaitu tidak menggunakan

nitrogen cair dan mampu mempertahankan fertilitas spermatozoa (Vishwanath and Shannon, 2000), sederhana (proses, peralatan, laboratorium), menghasilkan dosis straw yang lebih banyak dan fertilitas yang lebih tinggi (Situmorang, 2003; Akhter *et al.*, 2015). Salah satu kekurangannya adalah daya simpannya yang lebih pendek.

Pada penyimpanan 5°C, spermatozoa akan mengalami penurunan kualitas semen karena adanya defisit energi dan kerusakan membran yang diakibatkan oleh dan reaksi peroksidase atau *cold shock*. Membran sel yang rusak sangat berpengaruh terhadap fertilitas spermatozoa, meskipun motilitasnya masih baik. Adanya metabolisme dalam sel, menghasilkan radikal bebas yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi peroksidase. Strategi dalam mengatasi hal tersebut adalah dengan pemberian antioksidan (vitamin C, vitamin E, tocopherol, glutation, BHT dll). Pemberian prolin, carnitine, kolesterol dan phospolipid dapat meningkatkan daya hidup spermatozoa pada penyimpanan dingin 5°C. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa fertilitas menurun drastis setelah disimpan pada hari kedua atau selanjutnya. Meskipun terjadi penurunan fertilitas spermatozoa sampai dengan hari ke-10, kenyataan di lapang menunjukkan bahwa hal ini tidak berpengaruh terhadap angka kebuntingan. Konsentrasi spermatozoa pada hari ke 10 berkisar 7,5 juta/ml dengan nilai motilitas 30% masih layak digunakan dalam aplikasi IB (Situmorang, 2003).

## **2.5. Pengencer Semen Cair**

Dalam upaya mendukung kualitas spermatozoa tetap baik pada penyimpanan suhu 5°C dibutuhkan pengencer yang baik. Pengencer semen mempunyai peranan khusus dalam mendukung kesuksesan pembuatan semen cair. Pengencer yang digunakan harus memenuhi kriteria sebagai penyangga, sumber

energi/ nutrisi, mencegah *cold shock* dan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Beberapa pengencer komersial maupun pengencer alternatif banyak dikembangkan untuk mendapatkan pengencer yang berkualitas baik dan efisien.

Tris aminomethane kuning telur merupakan media pengencer semen yang tersusun dari berbagai komponen dengan fungsi tersendiri. Susilawati (2011) menyatakan komposisi kimia tris aminomethane dalam 100 ml adalah tris 1,262 g; asam sitrat 0,762 g; laktosa 1,500 g; fruktosa 0,500 g; raffinosa 2,700 g; streptomycin 0,100 g; aquadest 80 ml; penicillin 0,100 g dan kuning telur 20%. Tris dan asam sitrat berfungsi sebagai *buffer* (penyangga), menjaga tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Penicillin dan streptomycin berfungsi untuk mencegah pertumbuhan bakteri mikroorganisme yang merugikan spermatozoa. Sedangkan kuning telur berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler yang melindungi spermatozoa dari *cold shock* sekaligus sebagai sumber energi. Laktosa, fruktosa dan raffinosa berfungsi sebagai sumber energi spermatozoa dan krioprotektan (Rizal dkk, 2006). Rafinosa merupakan trisakarida gabungan dari galaktosa, glukosa dan fruktosa yang mengandung sumber energi lebih tinggi untuk spermatozoa. Namun demikian, diperlukan biaya yang lebih tinggi (mahal) sehingga kurang efisien.

*Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) merupakan pengencer yang mempunyai komposisi ionik hampir sama dengan cairan pada *caudal epididimis* diantaranya: komposisi ion, pH, dan osmolaritas. Komposisi seminal plasma diantaranya adalah asam sitrat, ergotionine, fruktosa, *glycerylphosphorylcholine*, hormone, antimikroba, immunoglobulin dan komposisi lainnya (Susilawati, 2011). Komposisi pengencer CEP-2 terdiri atas: NaCl 15 mmol/L, KCl 7 mmol/L, CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 3 mmol/L, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 4 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 11,9mmol/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol/

L, Fruktosa 55 mmol/L, Sorbitol 1 g/L, Tris 133,7 mmol/L, gentamicin-S 0,05 g/L, kuning telur 10% dan BSA 2 g/L, asam sitrat 42 mmol/L. Penggunaan pengencer CEP-2 dengan penambahan kuning telur 10% dapat mempertahankan motilitas dan menurunkan kerusakan membran spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa tetap terjaga. Dalam upaya mencegah *cold shock*, dalam pengencer dapat ditambahkan krioprotektan diantaranya kuning telur. Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi integritas sel spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C dengan mempertahankan integritas selubung lipoprotein (Indriani dkk, 2013). Zega, Ilyas, Hutahaean (2015) menyatakan bahwa konsentrasi kuning telur terbaik dalam pengencer two step<sup>tm</sup> adalah 15% karena mampu mempertahankan morfologi, viabilitas dan motilitas pada penyimpanan 10 hari. Gliserol sebagai krioprotektan dengan kadar 3,5 dan 7% mampu melindungi spermatozoa selama proses pembekuan (Mumu, 2009).

Susu skim merupakan susu dengan kandungan lemak sangat rendah (<1%) atau bahkan tanpa lemak. Pada umumnya susu skim mengandung semua unsur yang terdapat dalam susu pada umumnya, diantaranya: karbohidrat (energi), lemak, mineral, lipoprotein dan lesitin. Susu skim berperan sebagai *buffer* (larutan penyangga), sumber energi dan bersifat tidak toksik terhadap spermatozoa. Dalam pemanfaatannya, susu skim dikombinasi dengan kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler. Lipoprotein dan lesitin dalam susu skim berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari kejut dingin (*cold shock*) (Widjaya, 2011). Susu skim sebagai pengencer, mampu melindungi spermatozoa karena kandungan *casein misel* (protein utama susu) walaupun mekanismenya belum diketahui secara pasti. Keunggulan susu skim sebagai pengencer adalah dapat mendukung motilitas, daya hidup spermatozoa dan mendukung aktivitas antioksidan non enzimatis. Sedangkan

kuning telur mengandung *low density lipoprotein* (LDL) yang mampu berikatan dengan protein *Bovine Seminal Plasma* (BSP) sehingga mencegah terjadinya kerusakan lipid pada membran sel spermatozoa (Bergeron and Manjunath, 2006).