

Penggunaan Albumen untuk Separasi Spermatozoa Epididymis Domba Garut *(The Use of Albumen for Epididymal Sperm Separation of Garut Ram)*

Nurcholidah Solihati, T.D. Lestari, R. Setiawan, J. Arifin dan T. Hariyanti
Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas berbagai konsentrasi albumen untuk separasi spermatozoa epididymis Domba Garut. Penelitian ini menggunakan semen yang berasal dari *cauda* epididymis Domba Garut yang baru dipotong dan segera diolah di laboratorium. Perlakuan yang digunakan yaitu media separasi menggunakan berbagai kombinasi konsentrasi albumen pada lapisan atas dan bawah terdiri dari 10%-30%, 10%-50%, 10%-70% dan kontrol (tanpa media separasi). Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan lima kali ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada lapisan atas kombinasi konsentrasi albumen berpengaruh nyata ($p < 0.05$) dapat meningkatkan jumlah spermatozoa X dari rasio alamiahnya, dan pada lapisan bawah kombinasi konsentrasi albumen berpengaruh nyata ($p < 0.05$) dapat meningkatkan spermatozoa Y dari rasio alamiahnya. Disimpulkan bahwa kombinasi konsentrasi albumen yang digunakan cukup efektif digunakan untuk pemisahan spermatozoa X dan Y pada Domba Garut.

Kata kunci: albumen, separasi spermatozoa, Domba Garut

Abstract

The objectives of this research were to study the effectivity of combination of albumen concentration for epididymides sperm separation in Garut Ram. This research use semen from new slaughtered Garut Ram cauda epididymis and soon was processed at laboratorium. Treatments that were separation media with many combination of albumen concentration at upper layer and bottom layer i.e 10%-30%, 10%-50%, 10%-70% and control (without separation media). This research was designed by Completely Randomized Design with four treatments and five replications. Result of this research showed that at upper layer combination of albumen concentration significantly ($p < 0.05$) increase the number of X sperm from natural ratio, and at bottom layer combination of albumen concentration significantly ($p < 0.05$) increase the number of Y sperm on Garut Ram.

Key words: albumen, sperm separation, Garut Ram

Pendahuluan

Domba Garut merupakan plasma nutfah Indonesia yang memiliki keunggulan seperti pertumbuhan yang baik dan sifat *prolific*. Domba Garut jantan mempunyai nilai ekonomis yang tinggi dan berperan dalam industri pariwisata karena biasa digunakan sebagai domba laga. Domba Garut betina adalah jenis domba tropis bersifat *prolific* yaitu dapat beranak lebih dari 2 (dua) ekor dalam 1 siklus kelahiran.

Mengingat peran Domba Garut sebagai domba laga yang memiliki resiko mengalami cacat fisik atau bahkan kematian, maka harus diupayakan suatu teknologi pemanfaatan materi genetik yang dimilikinya. Salah satu upaya yang dapat ditempuh adalah dengan memanfaatkan

spermatozoa epididymis. Pemanfaatan spermatozoa epididymis dilakukan apabila ternak mengalami masalah dalam hal melakukan ejakulasi secara alamiah, cacat, tidak memberikan respons terhadap penampungan semen, bahkan pada ternak yang mati secara mendadak.

Teknologi separasi spermatozoa akan sangat menguntungkan apabila dapat diterapkan untuk tujuan mendapatkan Domba Garut dengan jenis kelamin sesuai keinginan. Dalam hal ini, pemanfaatan spermatozoa yang membawa sifat jantan atau yang mengandung kromosom Y akan sangat bermanfaat untuk pelestarian materi genetik unggul dari seekor pejantan Domba Garut yang memiliki permasalahan seperti tersebut di atas.

Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk separasi spermatozoa adalah dengan menggunakan albumen dengan kombinasi konsentrasi albumen pada lapisan atas dan bawah sebesar 10%-30% dan 10%-50% (Saili, 1999). Pada sapi perah, penggunaan kombinasi konsentrasi albumen tersebut cukup efektif untuk merubah rasio spermatozoa X dan Y dari rasio alamiah. Sejauh ini informasi mengenai penggunaan kombinasi konsentrasi albumen terhadap Domba Garut belum tersedia, sehingga serangkaian penelitian harus dilakukan untuk mendapatkan informasi yang lengkap dalam kaitan aplikasi terhadap Domba Garut.

Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran. Semen yang digunakan adalah semen asal *cauda* epididymis Domba Garut yang baru dipotong. Albumen yang digunakan dilarutkan dalam larutan BO (Brackett-Oliphant) dengan konsentrasi sesuai kebutuhan.

a. Persiapan Semen

Spermatozoa *cauda* epididymis dikoleksi dengan cara membuat sayatan-sayatan pada *cauda* epididymis menggunakan gunting stainless steel steril, kemudian dibilas-tekan pada petridis. Larutan spermatozoa yang diperoleh kemudian dicuci dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit, untuk memperoleh endapan spermatozoa.

b. Separasi Spermatozoa

Endapan spermatozoa yang diperoleh kemudian ditambahkan larutan BO hingga konsentrasinya mencapai 200 juta sel/ml. Sampel semen sebanyak satu milliliter dimasukkan kedalam kolom yang berisi medium pemisahan spermatozoa dan dibiarkan mengendap selama satu jam pada suhu 28°C. Selanjutnya setiap fraksi semen disedot dengan pipet dan ditampung dalam tabung sentrifus. Sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan endapan spermatozoa yang telah bersih dari medium pemisahan. Kemudian ditambahkan kembali dengan larutan BO untuk selanjutnya dibuat preparat ulas.

c. Perlakuan

Perlakuan yang dicobakan pada penelitian ini terdiri dari :

1. Kontrol : semen dilarutkan dalam larutan BO tanpa albumen.

2. Kombinasi konsentrasi albumen 10% (v/v) pada lapisan atas (A10/30) dan 30% (v/v) pada lapisan bawah (B30).
3. Kombinasi konsentrasi albumen 10% (v/v) pada lapisan atas (A10/50) dan 50% (v/v) pada lapisan bawah (B50).
4. Kombinasi konsentrasi albumen 10% (v/v) pada lapisan atas (A10/70) dan 70% (v/v) pada lapisan bawah (B50).

d. Peubah yang Diukur

Peubah yang diukur adalah rasio spermatozoa X dan Y pada lapisan atas dan lapisan bawah. Evaluasi dilakukan secara morfometri.

Pengukuran sperma dari masing-masing lapisan semen dilakukan dengan cara membuat preparat ulas terlebih dahulu. Pengukuran panjang dan lebar kepala spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop cahaya pada pembesaran 10 x 100 dengan menggunakan micrometer. Jumlah spermatozoa yang dihitung dari masing-masing lapisan minimal 100 sel spermatozoa. Luas kepala spermatozoa dihitung dengan menggunakan metoda integral *Riemann* (Purcell dan Vanberg, 1987) dan analisis regresi untuk mengetahui hubungan antara ukuran panjang dan lebar dengan luas kepala spermatozoa.

$$LKS = (0.8988 \times P \times L) - 1.63$$

Keterangan:

- LKS : luas kepala spermatozoa
 0.8988 : faktor koreksi yang dibangkitkan dari data yang ada dengan menerapkan metoda integral untuk menentukan luas kepala spermatozoa dari setiap satuan ukuran dan metoda regresi untuk menentukan hubungan ukuran panjang dan lebar dengan luas kepala spermatozoa
 1.63 : nilai konstanta regresi
 P : panjang kepala spermatozoa
 L : lebar kepala spermatozoa

e. Rancangan Percobaan dan Analisis Statistika

Penelitian ini akan dilaksanakan secara eksperimental laboratoris. Penelitian dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan lima kali ulangan. Analisis data dilakukan pada setiap lapisan albumen terhadap masing-masing perolehan spermatozoa X dan Y. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Varians, dan perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan uji jarak berganda Duncan (Gaspersz, 1991).

Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Semen Segar

Evaluasi terhadap semen segar asal *cauda* epididymidis pada penelitian ini dilakukan secara makroskopis maupun mikroskopis. Evaluasi secara makroskopis meliputi warna, bau, volume yang terkoleksi dan pH, sedangkan secara mikroskopis meliputi konsentrasi spermatozoa, motilitas spermatozoa, presentase spermatozoa hidup, persentase membran plasma utuh dan abnormalitas. Hasil evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Semen Segar

Parameter	Nilai
Warna	Krem
Volume	0,52 ml
Bau	Khas sperma
pH	6,9 – 7,1
Konsentrasi Total	12.900 sel/ml
Motilitas	70,56%
Presentase sperma hidup	80,03%
Presentase membrane plasma utuh (MPU)	76,64%
Abnormalitas	9,85%

Warna semen *cauda* epididymidis Domba Garut pada penelitian ini lebih cenderung krem, hal ini disebabkan konsentrasi spermatozoa yang sangat tinggi. Menurut Senger (1999), konsentrasi pada *cauda* epididymidis yang normal adalah 10.000–50.000 juta/ml, pada *caput* dan *corpus* 8.000–25.000 juta/ml, sedangkan menurut Rizal *et al.* (2003) bahwa konsentrasi spermatozoa *cauda* epididymidis pada Domba Garut rata-rata 13.993,33 juta/ml.

Derajat keasaman atau pH sangat mempengaruhi hidup dan mati spermatozoa. Variasi pH diduga disebabkan oleh konsentrasi asam laktat yang merupakan produk akhir metabolisme. Tingkat keasaman semen yang diperoleh pada penelitian ini adalah 6,9-7,1. Hasil ini relatif berada pada kisaran pH semen yang normal, seperti yang dilaporkan oleh Rizal *et al.* (2003), menyatakan bahwa pH semen domba berkisar 6,8-7,2. Menurut Toelihere (1993), pada umumnya spermatozoa sangat aktif dan tahan hidup lama pada pH 7,0, namun motilitas parsial dapat dipertahankan pada pH antara 5,0-10.

Nilai MPU hasil penelitian ini sebesar 76,56%. Keutuhan membran plasma sangat dibutuhkan untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilan dalam membuahi sel telur. Dengan demikian, nilai yang ditunjukkan oleh

presentase membran plasma utuh mempunyai nilai toleransi kuat terhadap nilai persentase hidup spermatozoa. Apabila membran plasma rusak, maka proses metabolisme akan terganggu yang akan menimbulkan akibat yang fatal bagi spermatozoa (Saili, 1999).

Motilitas spermatozoa *cauda* epididymis hasil penelitian ini sebesar 70,56%. Motilitas merupakan kemampuan gerak maju individu spermatozoa didalam lingkungan zat cair. Telah diketahui bahwa fungsi pergerakan spermatozoa adalah membantu spermatozoa menembus sel-sel pelindung yang mengelilingi sel telur dan juga untuk dapat melewati mukosa pada cerviks masuk kedalam uterus, terutama pada domba dan kambing yang spermatozoanya ditempatkan di mulut cerviks pada saat inseminasi buatan. Toelihere (1993), menyatakan bahwa motilitas merupakan ciri utama yang dijadikan patokan untuk program IB, sedangkan semen yang layak digunakan dalam program IB harus memiliki motilitas paling sedikit 40%. Adapun rataan motilitas pada Domba Garut adalah 76,7% (Rizal *et al.*, 2003).

Abnormalitas spermatozoa dibedakan atas abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer terjadi pada saat spermatogenesis seperti kepala besar, kepala kecil, kepala pipih dan lain-lain. Abnormalitas sekunder terjadi ketika spermatozoa berada di dalam saluran epididymis, seperti terdapatnya butiran sitoplasma pada semen ejakulat, spermatozoa tanpa kepala, ekor melingkar, ekor melengkung dan lain-lain (Briz *et al.*, 1996). Nilai abnormalitas spermatozoa yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 9,85% lebih rendah daripada yang dilaporkan Rizal dan Herdis (2005) yaitu bahwa presentase spermatozoa abnormal dan butiran sitoplasma spermatozoa segar *cauda* epididymidis Domba Garut masing-masing rata-rata 10,83% dan 8,5%.

Berdasarkan evaluasi baik secara makroskopis maupun mikroskopis dapat dikatakan bahwa kualitas spermatozoa *cauda* epididymis Domba Garut hasil penelitian ini memenuhi syarat kualitas untuk inseminasi buatan. Selanjutnya, semen yang memenuhi syarat kualitas diproses untuk mendapatkan perlakuan separasi

Konsentrasi Spermatozoa Setelah Separasi

Konsentrasi spermatozoa yang terdapat dalam fraksi semen bagian atas dan bawah setelah pemisahan spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil pemisahan menunjukkan bahwa konsentrasi terendah pada lapisan bawah 70% yaitu sebesar 18,8 juta sel/ml. Hal ini mungkin disebabkan

tingkat kepekatan albumen yang padat sehingga sperma sulit untuk menembusnya, sedangkan konsentrasi terbesar berada pada lapisan atas A10%-70% yaitu sebesar 43,4 juta sel/ml. Hal ini dapat disebabkan karena bertumpuknya sperma pada bagian atas yang tidak bisa menembus bagian bawah 70% yang konsentrasinya lebih besar. Menurut Ericsson *et al.*, (1973) hal tersebut disebabkan karena penambahan BSA kedalam pengencer meningkatkan viskositas dan densitas pengencer sehingga membatasi jumlah sperma yang masuk, yaitu sperma yang benar-benar motil.

Tabel 2. Konsentrasi Spermatozoa pada Setiap Fraksi

Perlakuan	Konsentrasi awal	Konsentrasi setelah separasi
	(juta/ml)	(juta/ml)
A10%-30%	200	24,4
B30%	200	24,2
A10%-50%	200	38,5
B50%	200	25,2
A10%-70%	200	43,4
B70%	200	18,8

Hasil Evaluasi terhadap Rasio Spermatozoa X dan Y secara Morfometrik

Evaluasi spermatozoa secara morfometrik dilakukan dengan cara mengukur panjang dan lebar dari kepala spermatozoa dibawah mikroskop cahaya pembesaran 10 x 40 dengan bantuan alat micrometer. Penetapan rumus untuk menentukan luas kepala spermatozoa domba digunakan metode integral *Reimann* untuk menentukan luasan kepala spermatozoa dari setiap pengukuran luas kepala spermatozoa. Hasil evaluasi terhadap larutan semen sebelum dan setelah separasi menggunakan media albumen ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Jumlah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y Sebelum Separasi (S0) dan Setelah Separasi Menggunakan Albumen

Perlakuan	Jumlah Spermatozoa Pembawa Kromosom (%)	
	X	Y
	S0	49,20
A10-30	60,60	39,40
B30	43,80	56,20
A10-50	59,80	44,28
B50	44,00	56,00
A10-70	61,60	38,40
B70	37,60	62,40

Berdasarkan Tabel 3 tampak bahwa rasio antara spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada perlakuan S0 hampir seimbang (49,201% : 50,80%). Di lapisan atas (A) pada seluruh perlakuan, rasio spermatozoa pembawa kromosom X (spermatozoa X) lebih besar dibanding pembawa kromosom Y (spermatozoa Y). Sebaliknya di lapisan bawah (B), rasio spermatozoa Y lebih besar dibanding spermatozoa X. Hal ini dapat disebabkan karena konsentrasi albumen yang tinggi pada lapisan bawah menyebabkan sulit ditembus oleh spermatozoa, hanya spermatozoa yang memiliki motilitas tinggi yang mampu menembus lapisan bawah. Hasil ini sesuai dengan pendapat Goodall dan Robert (1976) yang menyatakan bahwa spermatozoa pembawa kromosom Y memiliki motilitas yang lebih tinggi dibanding dengan spermatozoa pembawa kromosom X. Demikian pula Ericsson dan Glass (1982) melaporkan bahwa spermatozoa Y mempunyai gerakan yang lebih cepat dan ukuran yang lebih kecil karena mengandung lebih sedikit DNA dibandingkan spermatozoa X.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lapisan atas dapat digunakan untuk separasi spermatozoa dengan tujuan untuk memperoleh spermatozoa X, sedangkan lapisan bawah untuk memperoleh spermatozoa Y. Hasil ini juga mendukung laporan Saili (1999) bahwa spermatozoa hasil pemisahan pada fraksi bawah dipandang cukup layak untuk menghasilkan spermatozoa pembawa kromosom Y, dan fraksi atas cukup layak untuk menghasilkan spermatozoa pembawa kromosom X.

Hasil analisis statistik terhadap persentase sperma X pada lapisan atas ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Perolehan Spermatozoa X pada Fraksi Atas

Perlakuan	Spermatozoa X	Signifikansi (0,05)
%.....	
A10%-70%	61,60	a
A10%-30%	60,60	a
A10%-50%	59,80	a
S0/control	49,20	b

Keterangan : huruf yang sama ke arah kolom menyatakan perlakuan tidak berbeda nyata (p<0,05)

Berdasarkan Tabel 4. dapat diketahui bahwa perlakuan A10%-70% (61,6%) menghasilkan rasio sperma X paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan A10%-30%

(60,6%), A10%-50% (59,8%) dan S0/kontrol (49,2%). Hal ini dapat disebabkan semakin tinggi konsentrasi albumen pada lapisan bawah maka semakin sulit untuk sperma melakukan penembusan terhadap lapisan albumen tersebut. Dengan demikian semakin tinggi konsentrasi albumen pada lapisan bawah maka semakin sedikit sperma yang terdapat di lapisan bawah tersebut yang mengakibatkan sperma akan terkonsentrasi di lapisan atas. Selain itu, bentuk dan berat sperma X lebih besar dengan pergerakan yang lambat menyebabkan hanya sebagian kecil saja sperma X yang menembus lapisan bawah. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian Ke-hui cui dan Matthews (1993) yang menunjukkan bahwa ukuran spermatozoa X lebih besar dibanding spermatozoa Y.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap persentase spermatozoa X pada lapisan atas. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa persentase sperma X dari perlakuan A10%-70%, A10%-50% dan A10%-30% tidak berbeda nyata ($p < 0,05$), namun ketiganya nyata lebih tinggi dibandingkan dengan S0/kontrol. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi albumen yang digunakan pada lapisan atas cukup efektif untuk meningkatkan perolehan spermatozoa X dari rasio alamiahnya.

Hasil analisis statistik terhadap sperma Y pada lapisan bawah ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Perolehan Spermatozoa Y pada Fraksi Bawah

Perlakuan	Spermatozoa Y	Signifikansi (0,05)
%.....	
B70%	62,4	a
B50%	56,0	b
B30%	56,2	b
S0/control	50,8	b

Keterangan : huruf yang sama ke arah kolom menyatakan perlakuan tidak berbeda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan Tabel 5. dapat diketahui bahwa lapisan B70% (62,4%) menghasilkan persentase sperma Y paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan B50% (56,2%), B30% (56,0%), dan S0/kontrol (50,8%). Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase sperma Y. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa perlakuan B70% menghasilkan persentase sperma Y nyata lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, namun antara B50%, B30% dan S0 tidak berbeda nyata.

Walaupun secara statistik konsentrasi albumen 30% dan 50% pada lapisan bawah tidak menunjukkan pengaruh yang nyata dalam peningkatan perolehan spermatozoa Y, metode separasi tersebut masih dapat meningkatkan perolehan jumlah sperma Y dari rasio alamiahnya yang tentunya dapat meningkatkan peluang untuk memperoleh jenis kelamin jantan.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa kombinasi konsentrasi albumen 10%-30%, 10%-50% dan 10%-70% cukup efektif untuk digunakan sebagai media separasi spermatozoa epididymis Domba Garut.

Daftar Pustaka

- Briz, M.D., S. Bonet, B. Pinart and R. Camps. 1996. *Sperm Malformation throughout the Boar Epididymal Factors that Protect Ejaculated Bovine Sperm during In Vitro Storage*. *J. Reprod. fertil.* 117: 199-205.
- Ericsson, R.J. and R.H. Glass. 1982. Functional differences between sperm bearing the X- or Y-chromosome. In *Prospects for Sexing Mammalian Sperm*. S.P. Amann and G.E. Seidel, Jr. (Ed.). 1982. Colorado Ass. Univ. Press, USA.
- Ericsson, R.J., C.N. Langevin and M. Nishino. 1973. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* (246) : 421-424.
- Gaspersz, V. 1991. *Teknik Analisis dalam Penelitian Percobaan*. Tarsito, Bandung.
- Goodall, H. And A.M. Roberts. 1976. Differences in motility of human X and Y bearing spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* (48) : 433-436.
- Ke-hui Cui and C.D. Matthews. 1993. X larger than Y. *Nature* (366) : 117-118.
- Purcell, E.J. and Van Berg. 1987. *Kalkus and Geometry Analisis*. Terjemahkan oleh Susila, I.Y., B. Kartasmita dan Rawuh. Erlangga. Jakarta.
- Rizal, M. dan Herdis. 2005. *Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Domba Garut Yang Dikriopreservasikan Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris*. Hayati 12: 61-66.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2003. Pengaruh lama penyimpanan epididimis domba pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa epididimis. *Seminar Nasional dan Gelar Produk "Pengelolaan dan Pemanfaatan Keanekaragaman Hayati dalam Kerangka Pembangunan Berkelanjutan"*. Pusat Studi Ilmu Hayati, Lembaga Penelitian, IPB. Bogor.
- Saili, T. 1999. Efektivitas Penggunaan Albumen Sebagai Medium Separasi Dalam Upaya Mengubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y pada Sapi. Tesis. PPS IPB, Bogor.

Senger, P.L. 1999. The organization and function of the male reproduction system. *In* : Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conception, Inc., Pullman. Pp.. 32-57.

Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa-Bandung.