

Penelitian

Status Akrosom dan Kualitas *Post-Thawed* Spermatozoa pada Beberapa Rumpun Sapi dari Dua Balai Inseminasi Buatan

(*Acrosome Status and Quality of Post-Thawed Sperm from Several Cattle Breed of Two Artificial Insemination Centre*)

Yulida Nofa¹, Ni Wayan Kurniani Karja^{2*}, Raden Iis Arifiantini²

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

²Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

*Penulis untuk korespondensi: karjanwk13@gmail.com

Diterima 8 Maret 2017, Disetujui 12 Mei 2017

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kualitas dan status akrosom spermatozoa semen beku pasca-thawing beberapa rumpun sapi dari dua Balai Inseminasi Buatan (BIB). Semen beku dari sapi limousin, ongole, simental dan brahman yang di-thawing di dalam air hangat (37 °C) selama 30 detik dan kemudian dievaluasi motilitas spermatozoa, viabilitas, dan membran plasma utuh (MPU). Evaluasi Status akrosom spermatozoa menggunakan pewarnaan *Trypan Blue - Giemsa* (TBG) dan *Coomassie Blue* (CB). Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas (51 ± 1,87%) dan MPU spermatozoa (72,53 ± 1,68%) dari sapi ongole lebih tinggi daripada rumpun sapi yang lainnya pada BIB A (P<0,05). Namun, dari BIB B, motilitas dan MPU dari limousin lebih tinggi dari rumpun lainnya (P <0,05) dengan persentase masing-masing 51 ± 1,58% dan 72,60 ± 0,62%. Spermatozoa dengan TAU (95,40 ± 0,79%) dari rumpun sapi ongole menggunakan CBB G250 pada BIB B lebih tinggi dibandingkan 3 rumpun sapi lainnya (P<0,05). Akrosom spermatozoa dapat dievaluasi menggunakan TBG dan CBB G250. Namun, TBG lebih kompleks dan untuk mendapatkan hasil yang memuaskan membutuhkan jangka panjang.

Kata kunci: akrosom spermatozoa, *Coomassie Brilliant Blue G250*, *Trypan blue -Giemsa*, semen beku

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the quality and acrosomal status of frozen-thawed semen of several cattle breeds from two Artificial Insemination Centre (AIC). Frozen semen of Limousine, ongole, simmental and brahman bulls were thawed at warm water (37 °C) for 30 seconds and then evaluated for the sperm motility, viability, and Plasma Membrane Integrity (PMI). Acrosome status of sperm were assessed using *Trypan Blue-Giemsa* (TBG) and *Coomassie Brilliant Blue* (CBB G250) staining. The results showed that the motility (51 ± 1.87%) and PMI (72.53 ± 1.68%) of ongole bull was higher than others breeds in AIC A (P<0.05). However, of AIC B, the motility and PMI of limousine was higher than other breeds (P<0.05) with percentage of 51 ± 1.58% and 72.60 ± 0.62% respectively. Sperm with Integrity Akrosom (IA) (95.40 ± 0.79%) of ongole breeds using CBB G250 staining in AIC B was higher than 3 other breeds (P<0.05). In conclusion, acrosome intact can be evaluated using TBG and CBB G250. However, TBG is more complex and to get the satisfied result requires long term.

Keywords: sperm acrosome, *Coomassie Blue*, *Trypan Blue-Giemsa*, frozen bull Semen

PENDAHULUAN

Kriopreservasi semen merupakan suatu teknik penyimpanan materi genetik (spermatozoa) dalam keadaan beku. Pembekuan semen bertujuan untuk pemanfaatan pejantan secara optimal dalam

mengatasi keterbatasan jumlah pejantan dan penghematan biaya dalam pemeliharaan pejantan. Semen beku saat ini diproduksi oleh Balai Inseminasi Buatan (BIB) Nasional dan Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD). Semen beku yang diproduksi harus sesuai dengan persyaratan mutu yang ditetapkan

oleh Badan Standardisasi Nasional (BSN) yang tertuang dalam Standar Nasional Indonesia (SNI) Nomor 4869.1: 2008 mengenai semen beku sapi (Sukmawati *et al.*, 2015). Pengujian kualitas semen beku sesuai persyaratan mutu yang ditetapkan pada SNI Nomor 4869.1: 2008 tersebut adalah penilaian motilitas dan gerakan individu saja. Beberapa indikator lain yang diperlukan untuk prediksi kemampuan fertilisasi spermatozoa salah satunya adalah pengujian status akrosom.

Indikator yang digunakan dalam prediksi kemampuan fertilisasi spermatozoa ditunjukkan berdasarkan motilitas dan skor gerakan individu, tetapi indikator tersebut dirasa belum mewakili secara keseluruhan kemampuan spermatozoa dalam keberhasilan fertilisasi. Motilitas dan gerakan individu spermatozoa hanya menunjukkan kemampuan spermatozoa hidup dan kecepatan bergerak normal untuk melewati organ reproduksi betina. Menurut Neild *et al.*, (2005) untuk keberhasilan fertilisasi, spermatozoa harus memiliki akrosom dalam kondisi utuh untuk dapat melakukan fungsi reaksi akrosom pada waktu yang tepat, melepaskan enzim serta memfasilitasi spermatozoa dalam menembus zona pelusida. Proses pembekuan semen, akan mengondisikan spermatozoa terpapar pada suhu rendah dalam nitrogen cair dengan suhu -196 °C. Proses pembekuan ini akan menyebabkan kejutan dingin, stres osmotik dan pembentukan kristal es. Ketiga kejadian tersebut akan menyebabkan kualitas spermatozoa menurun dalam motilitas, viabilitas, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran (Holt, 2000). Penurunan fungsi membran sel berhubungan dengan kemampuan spermatozoa untuk membuahi oosit (Flesch *et al.*, 2000).

Perubahan komponen lipid pada membran spermatozoa tersebut dapat mengganggu stabilitas membran serta berpotensi mengalami kerusakan akrosom (Esteves *et al.*, 1998; Cross & Hanks, 1991). Keutuhan akrosom merupakan kunci keberhasilan fertilisasi. Hanya spermatozoa dengan akrosom utuh yang mampu melakukan penetrasi zona pelusida dan melakukan fusi dengan membran plasma oosit (Celeghini *et al.*, 2010), sehingga integritas akrosom merupakan salah satu indikator penting dalam menilai fertilitas spermatozoa yang sudah dibekukan.

Keutuhan akrosom spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan metode pewarnaan *Chlortetracycline* (Wattimena, 2006) atau dengan teknik histokimia lektin seperti yang dilaporkan oleh Fannessia *et al.* (2015). Kedua metode tersebut

sangat kompleks dan memerlukan mikroskop *Fluorescens* untuk mengamati hasil pewarnaan sehingga kurang aplikatif bila diterapkan di lapang. Metode pewarnaan yang lebih sederhana yang mungkin bisa diterapkan di lapang adalah pewarnaan *Trypan Blue-Giemsa* (TBG) dan *Coomassie Blue* (CB). Pewarnaan TBG telah digunakan dalam evaluasi akrosom spermatozoa berbagai spesies seperti sapi dan babi (Kovacs & Foote, 1992) sedangkan pewarna CB dilaporkan pada spermatozoa kelinci (Larson & Miller, 1999) dan manusia (De Oliveira *et al.*, 2011). Kedua pewarna tersebut memiliki kemampuan afinitas yang tinggi terhadap protein dan diharapkan mampu untuk mewarnai akrosom spermatozoa.

Pewarnaan TBG merupakan pewarna yang mampu berikatan dengan protein sel. *Giemsa* diketahui memiliki berat molekul kecil dan mampu melewati membran sel yang melindungi bagian akrosom spermatozoa. Pewarna CB biasa digunakan dalam identifikasi protein. *Coomassie Blue* dapat mengikat protein membran seperti glikoprotein dengan berat molekul 30 kDa (Bolwell *et al.*, 1980). Mengingat akrosom sangat penting untuk fertilisasi, oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kualitas dan status akrosom spermatozoa semen beku pada beberapa rumpun sapi dari salah satu BIB dan BIBD.

BAHAN DAN METODE

Thawing Semen Beku

Semen beku dikeluarkan dari container penyimpanan menggunakan pinset dan dimasukkan ke dalam *waterbath* suhu 37 °C selama 30 detik, seluruh isi straw dimasukkan ke dalam *microtube*. Selama pengamatan semen disimpan dalam *water bath* (37 °C).

Motilitas dan Gerakan Individu

Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan untuk mengetahui jumlah spermatozoa yang bergerak maju ke depan. Preparat disiapkan dengan cara meneteskan 20 µL semen menggunakan mikropipet di atas objek gelas kemudian ditutup dengan gelas penutup. Persentase motilitas spermatozoa dinilai dari 0 hingga 100% secara estimasi pada lima lapang pandang dengan cara membandingkan jumlah spermatozoa yang bergerak maju ke depan dengan gerakan spermatozoa yang lainnya. Motilitas spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop Nikon FDX-35, pembesaran 400x dan dilengkapi *heating table* (37 °C).

Gerakan individu merupakan kecepatan spermatozoa bergerak maju ke depan. Nilai gerakan individu dengan sistem skor yaitu 1 (sangat lambat), 2 (lambat), 3 (sedang), 4 (cepat) dan 5 (sangat cepat).

Membran Plasma Utuh (MPU)

Pemeriksaan keutuhan membran plasma spermatozoa menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS-Test). Komposisi larutan HOS adalah 0,135 g fruktosa dan 0,0737 g *tri sodium citrate* 2H₂O dalam 10 mL air mili-Q. Sampel semen sebanyak 20 µL dimasukkan dalam 80 µL larutan HOS dan dibiarkan selama 30 menit dalam *water bath* (37 °C). Setelah diinkubasi 10 µL semen ditempatkan pada objek gelas dan ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya (Nikon FDX-35) dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang mengalami kerusakan membran plasma ditandai dengan ekor yang lurus sedangkan spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar atau menggembung. Jumlah spermatozoa diamati minimal 200 sel pada 10 bidang pandang.

Keutuhan Akrosom Spermatozoa

Pewarnaan Trypan Blue- Giemsa (TBG)

Pewarnaan TBG dimulai dengan meneteskan semen dan larutan *trypan blue* yang dilarutkan menggunakan NaCl 0.81% secara bersamaan lalu dihomogenkan perlahan, dibuat preparat ulas dan dikeringkan secara vertikal. Preparat diwarnai menggunakan larutan *neutral red* dengan komposisi (86 mL HCl 1,0 N, 14 mL *formaldehyde* 37% , 0,2 g *neutral red*), preparat diwarnai selama 2-5 menit dengan cara meratakan larutan ke permukaan preparat lalu dikeringkan, preparat dibilas menggunakan air mengalir serta dikeringkan kembali. Tahapan pewarnaan berikutnya preparat direndam dalam *staining jar* yang berisikan larutan *giemsa* 5%, dibiarkan pada suhu ruang selama 3 hari, kemudian dibilas kembali dengan mencelupkan ke dalam wadah berisi air selama 2 menit. Setelah dikeringkan, ulasan dihangatkan menggunakan *heating table* (40 °C) (Kovacs & Foote, 1992). Preparat ditutup menggunakan gelas penutup menggunakan perekat *entellan* dan evaluasi dilakukan pada 200 sel menggunakan mikroskop cahaya dengan lensa objektif perbesaran 400x. Spermatozoa dengan Tudung Akrosom Utuh (TAU) berwarna ungu pada bagian kepala sedangkan spermatozoa dengan akrosom yang tidak utuh akan

bewarna lavender pucat atau pudar. Status akrosom dihitung dengan menghitung jumlah spermatozoa dengan TAU dibagi dengan total jumlah spermatozoa dikali 100%.

Pewarnaan Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250)

Pewarna CBB G250 ditimbang sebanyak 27,5 mg, kemudian dilarutkan dalam 1,25 mL *methanol*, 2,5 mL *glacial acetic*, 6,2 ml air mili-Q dicampur hingga larut menggunakan *stirrer*. Semen diambil sebanyak 10 µL disentrifus pada 1400 rpm terlebih dahulu dalam 1 mL medium TALP. Supernatan dibuang dan endapan semen difiksasi menggunakan dua tetes *paraformaldehyde* 4% selama 10 menit. Sentrifus kedua menggunakan larutan *amonium acetate* pH 9, komposisi 0,7708 mg *amonium acetate* dengan menggunakan pelarut air mili-Q, setelah disentrifus selama 8 menit supernatan dibuang kembali dan endapan semen diambil menggunakan pipet, diteteskan bersamaan dengan larutan perwarna CBB G250 lalu dihomogenkan, kemudian dibuat preparat ulas dan dibiarkan selama 2 menit (De Oliveira et al., 2011). Preparat dibilas dan dikeringkan, selanjutnya preparat di tutup dengan gelas penutup yang telah ditambahkan satu tetes *entellan* sebagai perekat. Preparat dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x dan dihitung 200 sel. Spermatozoa dengan kepala berwarna biru gelap dikategorikan sebagai TAU sedangkan kepala spermatozoa yang tidak menyerap warna dikategorikan sebagai akrosom yang tidak utuh. Status akrosom dihitung dengan menghitung jumlah spermatozoa dengan TAU dibagi dengan total jumlah spermatozoa dikali 100%.

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan uji ANOVA dengan program SPSS 15,0. Data berupa motilitas, membran plasma dan keutuhan akrosom disajikan dalam bentuk persentase dengan rerata ± SEM.

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan motilitas spermatozoa *post thawing* berkisar antara 46-51% dan gerakan individu 2-3. Spermatozoa setelah pembekuan dan perlakuan *thawing* akan bergerak lebih lambat dibandingkan semen segar. Perbedaan kecepatan tersebut salah satunya adalah dalam semen beku diberikan bahan pengencer seperti skim

dan kuning telur, akibatnya gerakan akan lebih lambat.

Tabel 1 menunjukkan persentase motilitas spermatozoa antara rumpun sapi dan kedua BIB. Motilitas spermatozoa sapi ongole dan simental dari BIB A lebih tinggi dibandingkan di BIB B, namun limousin di BIB B menunjukkan motilitas yang lebih baik dibandingkan di BIB A, dan tidak terdapat perbedaan motilitas spermatozoa pada sapi brahman pada kedua balai ($P > 0,05$).

Tabel 2 menunjukkan gerakan individu spermatozoa pada beberapa rumpun sapi. Gerakan individu merupakan kecepatan spermatozoa maju ke depan untuk dapat melewati organ reproduksi betina mencapai fertilisasi. Gerakan individu dinilai menggunakan sistem skoring dengan nilai 1-5.

Gerakan individu dari semua rumpun sapi dari kedua BIB tidak terlihat ada perbedaan dengan rata-rata skor gerakan individu antara 2,20-2,40 ($P > 0,05$). Nilai gerakan antara 2,20-2,40 tersebut dapat diartikan bahwa gerakan spermatozoa antara lambat sampai sedang. Spermatozoa setelah pembekuan dan thawing akan bergerak lebih lambat dibandingkan semen segar. Perbedaan kecepatan tersebut salah satunya adalah dalam semen beku diberikan bahan pengencer seperti skim dan kuning telur, akibatnya gerakan akan lebih lambat. Proses pembekuan juga akan menyebabkan spermatozoa mengalami kerusakan sehingga gerakannya lebih lambat.

Keutuhan membran plasma merupakan hal mutlak yang harus dimiliki oleh spermatozoa. Membran plasma berfungsi sebagai pertahanan pertama sel dari lingkungan luar yang dapat merusak sel. Tabel 3 menunjukkan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa menggunakan larutan *hyposmotic swelling*.

Persentase MPU antar rumpun sapi pada BIB A menunjukkan nilai yang hampir sama antara 69,30 sampai dengan 72,53%. Sapi limosin dan brahman pada BIB B memiliki Nilai MPU sama, keduanya lebih tinggi dari ongole dan simental Tabel 3. Nilai MPU antara balai menunjukkan ongole dan simental pada BIB A lebih baik daripada BIB B.

Keberhasilan fertilisasi ditentukan oleh keberadaan/status akrosom, untuk dapat melakukan fungsi reaksi akrosom dan fusi pada oosit. Tabel 4 menunjukkan persentase Tudung Akrosom Utuh (TAU) pada beberapa rumpun sapi dari dua Balai Inseminasi Buatan.

Tabel 4 menunjukkan persentase TAU spermatozoa semua rumpun pada BIB A menggunakan CB atau TBG sama hasilnya dengan nilai antara 90,40 sampai 98,10%. Pewarnaan CB pada BIB B menunjukkan ongole mempunyai nilai TAU ($95,40 \pm 0,79\%$) lebih tinggi dibandingkan dengan 3 rumpun lainnya. Meskipun terdapat perbedaan nilai TAU antara rumpun sapi, hasil penelitian menunjukkan persentase TAU sudah dapat dikatakan baik berdasarkan laporan Hernandez et al., (2012).

PEMBAHASAN

Kualitas Spermatozoa Semen Beku Post-thawing

Spermatozoa setelah mengalami pembekuan dan perlakuan thawing akan bergerak lebih lambat dibandingkan semen segar. Perbedaan kecepatan tersebut salah satunya adalah dalam semen beku setelah diberikan bahan pengencer seperti skim dan kuning telur, akibatnya gerakan akan lebih lambat. Proses pembekuan juga akan menyebabkan spermatozoa mengalami kerusakan sehingga

Tabel 1 Motilitas spermatozoa semen beku pada BIB A dan BIB B (Rerata ± SEM)

Rumpun	BIB A	BIB B
Limousin	50 ± 1,58 ^{a,b,B}	51 ± 1,00 ^{a,A}
Ongole	51 ± 1,87 ^{a,A}	46 ± 1,00 ^{b,B}
Simental	51 ± 1,00 ^{a,A}	47 ± 2,00 ^{b,B}
Brahman	47 ± 1,22 ^b	46 ± 1,00 ^b

Superskrip huruf besar berbeda pada baris yang sama persentase motilitas rumpun sapi antara kedua balai menunjukkan perbedaan ($p < 0,05$). Huruf kecil berbeda pada kolom yang sama persentase motilitas antara rumpun sapi menunjukkan perbedaan ($p < 0,05$).

Tabel 2 Gerakan individu spermatozoa semen beku dari beberapa rumpun pada BIB A dan BIB B (Rerata ± SEM)

Rumpun	BIB A	BIB B
Limousin	2,20 ± 0,44	2,20 ± 0,44
Ongole	2,40 ± 0,40	2,20 ± 0,44
Simental	2,40 ± 0,40	2,20 ± 0,44
Brahman	2,20 ± 0,44	2,00 ± 0,00

gerakannya lebih lambat. Penurunan motilitas spermatozoa setelah pembekuan dan *thawing* dapat terjadi berkisar 24-64% (Ozkavukcu et al., 2008). Penurunan motilitas tersebut dapat disebabkan karena spermatozoa mengalami kejutan dingin serta stres osmotik yang berlebihan. Connell et al., (2002) melaporkan penurunan motilitas tersebut berkaitan dengan aktivitas dari mitokondria. Kerusakan mitokondria mengakibatkan terjadinya gangguan produksi *adenosine triphosphate* (ATP). Mitokondria merupakan sumber utama energi oksidatif sel dalam produksi ATP melalui rantai transpor elektron. Silva dan Gadella (2006) menambahkan energi berupa ATP merupakan hasil metabolisme di dalam membran mitokondria yang berperan dalam kerja mikrotubul sehingga spermatozoa mampu bergerak secara bebas.

Kualitas semen beku dipengaruhi oleh proses pembekuan, namun juga berkaitan erat dengan kualitas semen segar yang dihasilkan sebelum dilakukan proses pembekuan. Sarastina et al., (2012) peningkatan motilitas dapat diupayakan melalui pemberian pakan hijauan yang cukup dan pejantan-pejantan yang mempunyai umur cukup dewasa dengan manajemen penampungan dan pemeliharaan yang baik. Kualitas semen setiap individu pejantan berbeda-beda meskipun dipelihara dengan sistem dan manajemen pakan yang seragam (Sukmawati et al., 2015). Semen segar yang dihasilkan akan berkorelasi terhadap kualitas semen

beku, oleh karena itu perbedaan persentase kualitas semen beku yang diperoleh antara rumpun sapi pada balai yang sama maupun balai berbeda dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor di atas.

Keutuhan membran plasa merupakan hal mutlak yang harus dimiliki spermatozoa, membran plasma berperan penting dalam mengatur seluruh proses yang terjadi di dalam sel (Rizal et al., 2003). Persentase MPU spermatozoa rumpun sapi pada kedua balai sudah bisa dikategorikan baik. Komponen fosfolipid yang ditemukan pada kuning telur dan susu skim berperan dalam melindungi plasma membran dari efek *cold shock* (Medeiros et al., 2002). Fosfolipid melakukan fusi melalui membran spermatozoa, menggantikan beberapa fosfolipid membran yang telah rusak dengan demikian mengurangi efek dari kerusakan dikarenakan perubahan suhu (Graham dan Foote, 1987). Susu skim mengandung lipoprotein dan lesitin sehingga bisa digunakan dalam pengencer semen untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin (*cold shock*).

Keutuhan Akrosom Spermatozoa Semen Beku

Akrosom memegang peranan penting dalam proses fertilisasi. Inisiasi ikatan spermatozoa dengan zona pelusida akan memicu terjadinya reaksi akrosom dan menyebabkan pelepasan serta aktivasi enzim akrosom, sehingga spermatozoa mampu melakukan penetrasi zona pelusida (Miranda et al., 2009). Perbedaan nilai TAU yang diperoleh terkait

Tabel 3 Persentase MPU spermatozoa semen beku beberapa rumpun sapi *post thawing* dari dua BIB (Rerata ± SEM)

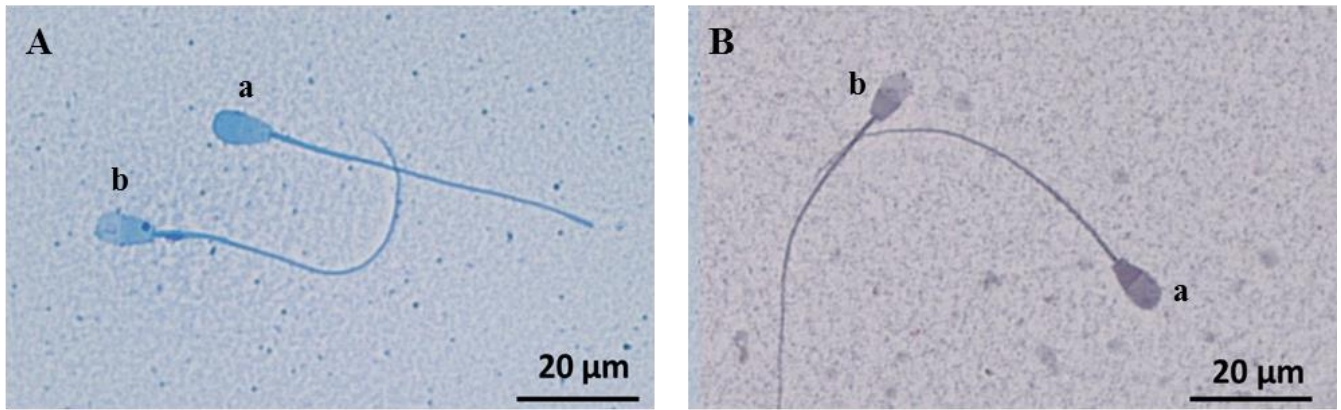
Rumpun	BIB A	BIB B
Limousin	71,50 ± 2,39	72,60 ± 0,62 ^a
Ongole	72,53 ± 1,68 ^A	64,90 ± 1,63 ^{C,B}
Simental	70,80 ± 2,43 ^A	66,20 ± 1,01 ^{b,C,B}
Brahman	69,30 ± 0,99	71,00 ± 0,99 ^{a,b}

Superskrip huruf besar berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan antar kedua balai pada rumpun sapi yang sama ($P < 0,05$). Huruf kecil berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan antar rumpun sapi pada balai yang sama ($P < 0,05$).

Tabel 4 Persentase tudung akrosom utuh (TAU) pada beberapa rumpun sapi pada Balai Inseminasi Buatan A dan Balai Inseminasi Buatan B (Rerata ± SEM)

Rumpun	BIB A		BIB B	
	CB	TBG	CB	TBG
Limousin	97,09 ± 0,71	90,40 ± 2,56	91,70 ± 1,54 ^b	88,40 ± 0,67
Ongole	98,10 ± 0,50	92,50 ± 0,94	95,40 ± 0,79 ^a	87,20 ± 0,60
Simental	97,91 ± 1,18	95,00 ± 1,18	87,20 ± 0,91 ^b	86,60 ± 0,92
Brahman	97,40 ± 0,36	90,85 ± 0,73	90,00 ± 0,65 ^b	88,15 ± 0,52

Superskrip huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan persentase TAU antara rumpun sapi BIB B pada pewarnaan CB ($P < 0,05$).



Gambar 1 Hasil pewarnaan akrosom menggunakan pewarna CBB G250 (A) dan pewarna TBG (B): (a) Tudung Akrosom Utuh (TAU), (b) akrosom yang tidak utuh.

dengan fungsi membran sebagai pelindung akrosom spermatozoa, diketahui kolesterol merupakan salah satu komponen penyusun membran spermatozoa. Moore *et al.*, (2005) melaporkan terjadi penurunan yang signifikan kolesterol dari membran spermatozoa setelah pembekuan. Kolesterol pada membran berfungsi sebagai agen kapasitas, jumlah dan distribusi kolesterol pada membran spermatozoa mengindikasikan tahapan kapasitas (Visconti *et al.*, 1999). Penipisan kolesterol pada membran merupakan salah satu tahapan pertama kejadian kapasitas yang ditandai oleh penurunan stabilitas membran (Tulsiani *et al.*, 1997).

Penipisan kolesterol pada membran dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap kalsium dan bikarbonat intraseluler untuk mengaktifkan *adenylyl cyclase* (AC), menghasilkan cAMP, dan mengaktifkan *protein kinase A* (PKA). *Protein kinase* membuka kanal ion pada membran dan memodulasi peningkatan kalsium intraseluler (Breitbart, 2003). Pada tahapan kapasitas ini terjadi perubahan aktivitas enzim, serta motilitas spermatozoa yang responsif terhadap reaksi akrosom (Ana *et al.*, 2007). Neild *et al.*, (2005) menambahkan reaksi akrosom merupakan proses pelepasan enzim penetrasi yang memungkinkan spermatozoa dapat menembus zona pelusida dan membuahi oosit. Namun, apabila reaksi akrosom terjadi sebelum spermatozoa mencapai tempat fertilisasi, spermatozoa akan kehilangan kemampuan untuk fertilisasi oosit. Spermatozoa harus dalam keadaan Tudung Akrosom Utuh (TAU) agar memiliki kemampuan dalam fertilisasi oosit, keutuhan akrosom tersebut dapat dievaluasi menggunakan pewarnaan CB dan TBG ditunjukkan pada Gambar 1.

Gambaran status akrosom spermatozoa pada gambar A menggunakan pewarnaan CBB G250: (a)

spermatozoa dengan TAU akan berwarna biru gelap (b) yang memiliki akrosom tidak utuh akan terlihat pudar/tidak terwarnai, sedangkan gambar B menggunakan pewarnaan TBG: (a) spermatozoa dengan TAU menyerap warna ungu (b) spermatozoa yang memiliki akrosom tidak utuh akan berwarna lavender pudat/pudar. Untuk memastikan akrosom yang rusak ditandai dengan bagian kepala yang tidak beraturan. Hasil pewarnaan spermatozoa menggunakan TBG menunjukkan pewarna *giemsa* memiliki kemampuan berikatan dengan protein pada membran, sehingga dapat diasumsikan bahwa *giemsa* dapat mewarnai protein membran. Kerusakan akrosom akan terlihat berdasarkan hasil pewarnaan spermatozoa yang tidak menyerap warna dengan baik. Namun, sampel semen beku menggunakan pengencer skim kuning telur, sehingga hasil pewarnaan kurang baik. Pewarnaan TBG kurang efektif digunakan dalam evaluasi semen beku, hal ini disebabkan komponen pengencer yang ikut terwarnai yang menyebabkan hasil pewarnaan lebih sulit untuk dianalisis, dan pewarnaan TBG membutuhkan waktu cukup lama untuk dapat dianalisis dibandingkan dengan pewarnaan CB (Kovacs dan Foote, 1992).

Pewarna CB merupakan pewarna yang biasa digunakan dalam identifikasi protein. *Coomassie Blue* mampu berikatan dengan protein membran, dengan cara berikatan dengan glikoprotein (Bolwell *et al.*, 1980). Membran akrosom spermatozoa terdiri atas *Inner Acrosome Membrane* (IAM) dan *Outer Acrosome Membrane* (OAM) yang berfungsi sebagai pelindung akrosom spermatozoa akan terwarnai. Protein spesifik penyusun membran spermatozoa akan terwarnai sehingga dapat dibedakan. sehingga dapat dibedakan. Apabila bagian dari akrosom sel spermatozoa mengalami kerusakan atau tidak utuh sel spermatozoa tidak mampu dalam menyerap

warna dengan baik dan hasil pewarnaan akan terlihat pudar. Ketidakberaturan di bagian kepala juga dapat dijadikan salah satu indikasi membran plasma telah mengalami kerusakan serta berpotensi terhadap kerusakan akrosom.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa karakteristik dan status akrosom spermatozoa beberapa rumpun sapi dari kedua BIB berbeda-beda antara kedua balai maupun antar rumpun sapi. Evaluasi status akrosom lebih efisien menggunakan perwarna CBB G250 dibandingkan dengan TBG.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Ana M, Salicioni, Mark D, Platt, Eva V, Wertheimer, Enid A, Alicia A, Julian S, Pablo E, Visconti. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. *Spermatology* 65: 245-259.
- Breitbart, H. 2003. Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. *Cell Molecular Biology* 49(3): 321-327.
- Bolwell GP, Callow JA, Evans. 1980. Preliminary characterization of putative gamete receptors from eggs and sperm of *fucus serratus*. *Journal Cellular* 43: 209-224.
- Celeghini ECC, Nascimento J, Raphael CFA, Andrade AFC, Arruda PR. 2010. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterináriae Zootecnia* 62(3): 536-543.
- Connell MO, Clure MN, Lewis SEM. 2002. The effect of cryopreservation on sperm morphology motility and mitochondrial function. *Human Reproduction* 17(3): 704-709.
- Cross NL, Hanks SE. 1991. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reproduction* 6(12): 79-83.
- De Oliveira VP, Marques MG, Simoes R, Assumpcao MEOD, Visintin JA. 2011. Influence of caffeine and chondroitin sulfate on swine sperm capacitation and in vitro embryo production. *Acta Science Veteriner* 39(2): 960.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A. 1998. Effect of in vitro incubation on spontaneous acrosome reaction in fresh and cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 43(2): 35- 42.
- Fannessia LD, Karja NWK, Adnyane IKM, Setiadi MA. 2015. Pelacakan kerusakan akrosom domba spermatozoa selama proses pembekuan dengan teknik histokimia lektin. *Journal Veteriner* 16(4): 560-568.
- Flesch FM, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. 2000. Capacitation induced molecular alterations in the plasma membrane of boar spermatozoa in relation to zona pellucida affinity. *Boar Semen Preservation* 4: 21-31.
- Graham JK, Foote RH. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull Spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* 24: 42-52.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62: 3-22.
- Kovacs A, Foote RH. 1992. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotechnology Histochemical* 67(3): 120-124.
- Larson JL, Miller DJ. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mollecular Reproduction and Development* 52: 445-449.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation. *Theriogenology* 57: 327-344.
- Miranda PV, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2009. Localization of low-density detergent-resistant membrane proteins in intact and acrosome-reacted mousesperm. *Biology Reproduction* 80: 897-904.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improve cryosurvival. *Cryobiology* 51: 241-249.
- Neild DN, Gadella BM, Aguero A, Stout TAE, Colenbrander B. 2005. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal Reproduction Science* 89: 47-56.
- Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. 2008. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *Journal of Assisted Reproduction Genetic* 25: 403-411.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang B. 2003. Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner* 7(3): 194-199.
- Sarastina, Susilawati T, Ciptadi G. 2012. Analisa Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa pada berbagai bangsa sapi menggunakan Computer

- Assisted Semen Analysis (CASA). *Jurnal Ternak Tropika* 6(2): 1-12.
- Silva PFN, Gadella BM. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978.
- Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. 2015. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 19(3): 168-175.
- Tulsiani DRP, Komiya Y, Araki. 1997. Mammalian fertilization: a carbohydrate mediated event. *Biology Reproduction* 57: 487-494.
- Visconti PE, Ning XP, Fornes MW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Developmental Biology* 214: 429-443.
- Wattimena J. 2006. Pengaruh waktu inkubasi terhadap pola kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa domba *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner* 11(4): 295-301.