

KAJI BANDING ANTARA PENGENCER TRIS DENGAN TCM-199 DALAM UPAYA PEMBEKUAN SEMEN SAPI HASIL PENYARINGAN SEPHADEX G-200

COMPARATIVE STUDY OF DILUTER TRIS AND TCM-199 IN FREEZING BULL SPERM AFTER SEPHADEX G-200 FILTRATION

Trinil Susilawati¹, Sutiman Bambang Sumitro², Soehartojo Hardjopranjoto³,
Mochammad Sasmito Djati², dan Gatot Ciptadi¹

¹Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145 INDONESIA,
Telp. (62-341) 551611 pes. 162; E-mail: trinil@malang.wasantara.net.id

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang INDONESIA

³Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya INDONESIA

ABSTRAK

Media Veteriner. 1999. 6(4): 9-13.

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang dan Balai Inseminasi Buatan Singosari pada bulan Agustus sampai Desember 1998. Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari metode pembekuan spermatozoa hasil seleksi jenis kelamin dengan menggunakan filtrasi sephadex G-200. Percobaan ini terdiri atas 10 kali ulangan dengan dua perlakuan yaitu krioprotektan ekstraseluler TCM-199+10% serum+14% kuning telur dan tris aminomethan-kuning telur. Parameter yang diukur meliputi persentase motilitas, hidup, kapasitas dan reaksi akrosom. Media TCM-199 kuning telur lebih dapat mempertahankan mutu semen dibandingkan dengan tris aminomethan kuning telur, dan proses pembekuan meningkatkan kapasitas dan reaksi akrosom.

Kata-kata kunci: sperma, media tris dan TCM-199, fertilitas, kapasitas, reaksi akrosom sperma

ABSTRACT

Media Veteriner. 1999. 6(4): 9-13.

This study was carried out at the Biology Laboratory of The Faculty of Mathematics and Natural Sciences and at The Artificial Insemination Centre Singosari Malang from August to December 1998. The aim of this experiment is to design the proper methods for sperms freezing after sephadex G-200 filtration. The works consisted of 10 repeated experiments were sperms were treated with extracellular cryoprotectant, either TCM-199+10% serum + 14% egg yolk on tris aminomethane + 14% egg yolk. Sperm vitality, motility, capacitation, and acrosome reaction were recorded. The results showed that TCM-199 could maintain the qua-

lity of sperm better than tris aminomethane. The freezing process induces capacitation and acrosomal reaction.

Key words: semen, tris and TCM-199 media, sperm motility, life sperm, capacitation, acrosome reaction

PENDAHULUAN

Inseminasi buatan (IB) dan alih mudiga (AM) merupakan produk bioteknologi di bidang peternakan. Penerapan IB dan AM dari bibit unggul dimaksudkan untuk memperbaiki mutu genetik dan produktivitas sapi perah dan sapi potong (Suhaji, 1995). Pemisahan spermatozoa sangat membantu efisiensi peternakan sapi perah dan sapi potong karena sapi induk akan melahirkan anak berjenis kelamin sesuai yang diharapkan. Susilawati *et al.* (1996) mendapatkan bahwa pemilihan jenis kelamin dapat dilakukan dengan penyaringan sephadex G-200 dan pada bagian filtrat akan didapatkan $\pm$ 83% spermatozoa X dengan mutu semen yang tetap baik atau mengalami penurunan motilitas hanya sekitar 10%. Akan tetapi ketika pembekuan berlangsung, didapatkan persentase motilitas yang sangat rendah yaitu sekitar 5%.

Tujuan penelitian ini adalah mencari pengencer yang baik antara *Tissue Culture Medium* (TCM) dan tris, dan mencari gambaran pola kapasitas spermatozoa pada proses pembekuan spermatozoa hasil seleksi jenis kelamin dengan penyaringan sephadex G-200.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi dan Kultur Jaringan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Brawijaya dan Balai Inseminasi Buatan (BIB) Singosari Malang.

Pengencer

Bahan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah tris aminomethan-kuning telur (yang digunakan oleh BIB Singosari) dan 10% *Fetal Bovine Serum* (FBS, Sigma, USA) dalam TCM-199 (Sigma, USA)+14% kuning telur. Uji *t* digunakan untuk menilai perbedaan hasil dari kedua jenis pengencer ini.

Pembuatan jel sephadex dalam kolom

Kolom berdiameter atas 1,8 cm, tinggi 17 cm, diameter bawah 0,1 cm diisi *glass wool* pada dasar lehernya dan pada ujung bawah di pasang selang karet. Kolom dipasang pada posisi tegak menggunakan statis.

Sebanyak satu gram sephadex diencerkan dalam 100 ml garam penyangga fosfat (*Phosphat Buffer Saline*, PBS) dulbeccos, diaduk merata, dan dimasukkan ke dalam kolom yang telah disediakan. Ketika pengisian ujung bawah dijepit dan ditunggu hingga gel sephadex mengeras.

Pemilihan semen

Sapi yang akan digunakan sebagai penghasil spermatozoa adalah sapi Bali yang ada di BIB Singosari. Penampungan semen dilakukan seminggu sekali. Semen yang memenuhi syarat untuk pembekuan di BIB Singosari adalah semen yang mempunyai motilitas spermatozoanya di atas 70% dan konsentrasi spermatozoa sebesar $2-5 \times 10^9$ spermatozoa/ml.

Penyaringan

Sebanyak satu mililiter sperma dimasukkan ke kolom dan penutup kolom bagian bawah dibuka. Agar terjadi aliran, maka ke dalam kolom ditetesi dengan 10% FBS dalam TCM-199+ kuning telur atau tris aminomethan-kuning telur sesuai dengan perlakuan secara terus menerus. Filtrat ditampung dalam tabung hingga berisi satu mililiter selama satu menit. Kemudian, digunakan tabung baru untuk menampung satu mililiter filtrat berikutnya. Demikian seterusnya sampai di dalam filtrat tidak ditemukan spermatozoa. Pengamatan dilakukan terhadap filtrat yang diperoleh dengan parameter pengamatan berupa konsentrasi, motilitas dan kapasitas.

Pembekuan

Tabung ke-3 sampai ke-7 hasil penyaringan dimasukkan ke *cool top* sampai dengan suhu 5 °C. Selanjutnya ditambahkan media mengandung gliserol dengan volume yang sama dan selanjutnya dimasukkan ke batang jerami plastik kecil (*ministraw*). Pembekuan dilakukan secara bertahap: (i) suhu -140 °C dengan uap nitrogen cair selama delapan menit, (ii) suhu -196 °C dengan memasukkannya ke goblet, dan (iii) kemudian ke dalam nitrogen cair.

Pemeriksaan mutu spermatozoa

Spermatozoa ditetaskan ke gelas obyek, ditutup dengan gelas penutup dan diamati menggunakan mikroskop cahaya

dengan pembesaran lensa obyektif 400x. Dari 100 spermatozoa yang diamati, dihitung spermatozoa yang bergerak maju.

Persentase hidup spermatozoa diamati dengan cara membuat preparat ulas spermatozoa dan diwarnai dengan pewarna eosin-nigrosin dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa obyektif 100x. Spermatozoa yang tidak berwarna adalah spermatozoa yang hidup dan dihitung sebanyak 100 spermatozoa dan abnormalitas spermatozoa juga dihitung dari 100 spermatozoa.

Kapasitasi spermatozoa dilakukan menggunakan metode Dasgupta *et al.* (1993). Larutan *chlortetracycline* (CTC, Sigma, USA) disiapkan segar setiap hari mengandung 750 µmol CTC/l dalam buffer 130 mmol HCL/l, 5 mmol *cysteine*/l (Sigma, USA), 20 mmol tris-HCL/l (pH akhir 7,8). Larutan disimpan dalam botol yang dibungkus dengan kertas aluminium untuk mencegah masuknya cahaya dan disimpan pada suhu 4 °C. Seratus mikroliter suspensi spermatozoa ditambah dengan 100 µl larutan CTC disimpan dalam tabung pemusing mikro (*microcentrifuge*) dan dibungkus dengan kertas aluminium. Sebanyak 10 µl suspensi ditetaskan pada gelas obyek bersih, ditambahkan 0,22 mol 1,4-*di-azabicyclo* (2,2,2,-)*Octane*/l (Dabco-Sigma, USA) dalam gliserol:PBS (9:1), dicampur hati-hati untuk memperlambat pematangan sinar fluoresen. Kemudian ditutup dengan kaca penutup dan disimpan di tempat terlindung cahaya dan bersuhu dingin. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop *epifluorescence* Nikon Optic BH-2 dengan saringan ungu-biru untuk 100 spermatozoa. Ada tiga kelompok spermatozoa yang diamati yaitu (i) dengan warna terang pada seluruh kepala spermatozoa yang berarti spermatozoa belum berkapasitasi, (ii) spermatozoa yang terang pada bagian atasnya saja yang berarti spermatozoa yang mengalami kapasitasi, dan (iii) spermatozoa yang tidak mengeluarkan pendaran warna terang di seluruh kepala yang berarti spermatozoa mengalami reaksi akrosom.

Penghitungan persentase motilitas, viabilitas, dan tahap kapasitasi spermatozoa dilakukan pada kelompok spermatozoa hasil penyaringan, sebelum pembekuan dan pasca *thawing*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Mutu spermatozoa setelah penyaringan

Persentase motilitas spermatozoa pada saat penyaringan mengalami penurunan yang sangat nyata ($P < 0,01$) pada media TCM-199+kuning telur maupun tris aminomethan+kuning telur. Rataan persentase motilitas pada semen segar, setelah penyaringan pada media TCM-199 dan pada tris aminomethan adalah 70 ± 0 , $49 \pm 2,98$ dan $51,11 \pm 3,33$. Persentase hidup juga mengalami penurunan yang sangat nyata ($P < 0,01$) pada media TCM-199+kuning telur dan tris aminomethan+kuning telur. Rataan persentase hidup segar, setelah penyaringan pada media tris aminomethan kuning telur dan

pada TCM-199+kuning telur adalah $86,66 \pm 2,35$, $68,66 \pm 3,00$ dan $64,33 \pm 3,04$. Akan tetapi, persentase motilitas dan hidup tidak berbeda nyata pada kedua pengencer. Penurunan persentase motilitas dan hidup spermatozoa dipengaruhi oleh media pemisahan, waktu pelaksanaan, suhu dan terpisahnya spermatozoa dengan plasma seminal selama proses penyaringan. Secara alami, plasma seminal berfungsi melindungi spermatozoa dari pengaruh luar dan merupakan media hidup. Ketika spermatozoa masuk ke plasma seminal, maka membran spermatozoa lebih stabil. Jadi dengan terpisahnya spermatozoa dari plasma seminal, membran spermatozoa menjadi tidak stabil, (Albert *et al.*, 1984, Yanagimachi, 1988, Hafez, 1993 dan Buhr, 1998).

Dibandingkan dengan penelitian terdahulu, mutu spermatozoa yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan yang diperoleh Susilawati *et al.* (1997). Kemungkinan hal ini dikarenakan penggunaan media yang ditambahkan kuning telur yang semula dimaksudkan untuk melindungi ketika proses pembekuan berlangsung. Namun, ternyata bahan tambahan tersebut justru memperlambat proses penyaringan sehingga terjadi pemborosan energi oleh spermatozoa.

Persentase abnormalitas spermatozoa setelah proses penyaringan mengalami peningkatan. Rataan pada semen segar, setelah penyaringan pada media tris aminomethan dan TCM-199 dan pada media TCM-199 adalah $10,11 \pm 1,27$, $13,88 \pm 1,97$ dan $13,00 \pm 1,69$. Peningkatan abnormalitas terjadi pada abnormalitas sekunder atau tersier, yaitu abnormalitas yang bukan karena proses spermatogenesis tetapi setelah ejakulasi. Dapat dikatakan bahwa peningkatan abnormalitas disebabkan oleh suhu, media pengencer, media penyaringan dan medan elektrostatis dari Sephadex selama proses penyaringan. Abnormalitas yang ditemukan berupa ekor patah dan bentuk ekor yang melingkar akibat dari syok osmotik.

Mutu spermatozoa hasil penyaringan setelah pembekuan

Persentase motilitas spermatozoa pada proses pembekuan spermatozoa mengalami penurunan motilitas antara

26,27-37,29%. Hal ini berarti proses perlindungan yang terdapat pada komponen-komponen penyusun media cukup baik. Persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa pada saat pasca *thawing* pada media tris aminomethan adalah $32,22 \pm 5,07$ dan $45,44 \pm 3,91$, sedangkan dalam media TCM-199 adalah $31,11 \pm 4,84$ dan $43,66 \pm 4,74$. Persentase abnormalitas pada tris aminomethan kuning telur meningkat dari $13,88 \pm 1,97$ menjadi $19,88 \pm 1,76$. Gambaran tentang penurunan persentase motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa selama proses pembekuan terpapar dalam Tabel 1 dan 2.

Dari pengamatan pasca *thawing* diperoleh hasil bahwa mutu semen yang mendapatkan penyaringan pada kedua media lebih rendah secara nyata dibandingkan semen yang tidak dilakukan pemisahan ($P < 0,05$). Namun, hasil ini masih lebih baik dibandingkan hasil yang diperoleh Susilawati *et al.* (1997). Persentase motilitas spermatozoa setelah penyaringan yang dibekukan hanya mencapai 10%. Hasil yang lebih baik ini kemungkinan dikarenakan penambahan kuning telur dilakukan sebelum penyaringan sehingga keutuhan membran spermatozoa dapat dipertahankan (Buhr, 1998).

Kapasitasi spermatozoa hasil penyaringan

Proses kapasitasi adalah suatu perubahan fungsi yang diamati dengan adanya perubahan konsentrasi Ca^{2+} di dalam kepala spermatozoa. Proses kapasitasi spermatozoa dapat diamati menggunakan teknik yang dikembangkan oleh Mattioli *et al.* (1996). Pada spermatozoa yang belum kapasitasi penyebaran Ca^{2+} merata di seluruh kepala spermatozoa sehingga seluruh kepala spermatozoa tampak berpendar kuning. Sedangkan yang sedang mengalami kapasitasi ion Ca^{2+} terdapat hanya pada 2/3 bagian ekuator kepala spermatozoa. Pada akhir kapasitasi, spermatozoa ditandai dengan terjadinya proses reaksi akrosom, yaitu membran kepala spermatozoa menjadi tidak stabil atau luruh yang ditandai dengan kandungan Ca^{2+} yang rendah, sehingga kepala spermatozoa tampak tidak berpendar dan hanya terdapat gambaran pita di kepala spermatozoa. Sistem pewarnaan yang digunakan adalah tampak warna fluoresen pada kepala sper-

Tabel 1. Rataan persentase motilitas, hidup dan abnormalitas spermatozoa setelah penyaringan dan pembekuan menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur

Mutu semen	Semen segar (%)	Setelah penyaringan (%)	Sebelum pembekuan (%)	Pasca <i>thawing</i> (%)
Motilitas	$70,00 \pm 0,00$	$51,11 \pm 3,33$	$42,22 \pm 3,63$	$32,22 \pm 5,07$
Hidup	$86,66 \pm 2,35$	$68,66 \pm 3,00$	$56,33 \pm 3,20$	$45,44 \pm 3,91$
Abnormalitas	$10,11 \pm 1,27$	$13,88 \pm 1,97$	$17,33 \pm 1,87$	$19,88 \pm 1,76$

Tabel 2. Rataan persentase motilitas, hidup dan abnormalitas spermatozoa setelah penyaringan dan pembekuan menggunakan pengencer TCM-199+kuning telur.

Mutu semen	Semen segar (%)	Setelah penyaringan (%)	Sebelum pembekuan (%)	Pasca <i>thawing</i> (%)
Motilitas	$70,00 \pm 0,00$	$49,44 \pm 2,98$	$38,44 \pm 5,47$	$31,11 \pm 4,84$
Hidup	$86,66 \pm 2,35$	$64,33 \pm 3,04$	$54,22 \pm 4,12$	$43,66 \pm 4,74$
Abnormalitas	$10,11 \pm 1,27$	$13,88 \pm 1,69$	$15,88 \pm 1,37$	$21,33 \pm 1,82$

matozoa bila memang mengandung Ca^{2+} .

Proses penyaringan merangsang proses kapasitasi spermatozoa yang nyata ($P<0,01$) baik dalam media TCM-199 maupun tris aminomethan+kuning telur. Tahapan kapasitasi spermatozoa selama proses pembekuan dengan pengencer TCM-199 dan tris aminomethan terpapar pada Tabel 3 dan 4.

Selama proses pembekuan terjadi peningkatan kapasitasi dan reaksi akrosom yang nyata ($P<0,05$) pada media TCM-199 dan sangat nyata ($P<0,01$) pada tris aminomethan. Media TCM-199 lebih mampu mempertahankan agar tidak terjadi kapasitasi karena selama proses pembekuan diharapkan tidak terjadi proses kapasitasi. Spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom memiliki membran kepalanya yang tidak stabil karena spermatozoa tersebut merupakan spermatozoa yang sudah siap membuahi oosit. Reaksi akrosom ada yang bersifat semu yang secara mikroskopik tampak seperti tidak ada akrosomnya, tetapi secara fisiologik belum berkapasitasi (Yanagimachi, 1988). Dikhawatirkan reaksi semu ini terjadi pada proses penyaringan dan pembekuan. Mengenai hal ini perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam lagi.

Tabel 3. Rataan persentase kapasitasi spermatozoa pada proses pembekuan menggunakan pengencer TCM-199+kuning telur

	Belum berkapasitasi	Kapasitasi	Reaksi akrosom
Hasil penyaringan	$61,38 \pm 1,70$	$22,32 \pm 3,89$	$16,30 \pm 3,09$
Sebelum pembekuan	$52,39 \pm 2,67$	$25,37 \pm 2,64$	$22,24 \pm 2,61$
Pasca thawing	$31,25 \pm 3,12$	$27,82 \pm 3,16$	$26,31 \pm 3,29$

Tabel 4. Rataan persentase kapasitasi spermatozoa pada proses pembekuan menggunakan pengencer TCM-199+kuning telur

	Belum berkapasitasi	Kapasitasi	Reaksi krosom
Hasil penyaringan	$59,32 \pm 2,67$	$23,58 \pm 2,53$	$17,11 \pm 3,10$
Pre Freezing	$54,80 \pm 2,83$	$25,17 \pm 1,68$	$20,03 \pm 2,30$
Post Thawing	$49,99 \pm 2,37$	$28,73 \pm 2,55$	$21,28 \pm 1,61$

KESIMPULAN

Metode pembekuan dua tahap menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur terbukti lebih baik dibandingkan TCM-199+kuning telur. Hal ini terlihat dari meningkatnya kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa setelah penyaringan dan pembekuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Albert, B., B. Bray, D. Lewis, J. Raff, M.K. Robert, dan J.D. Watson. 1984. Biologi Molekuler Sel. Gramedia. Jakarta. 556 hal.
- Buhr, M.M. 1998. Manipulation of Sperm to Improve Fertility in New Direction in Animal Production System Blair *et al* (eds.). *Proceeding of the annual meeting Canadian society of animal science*. July 5-8/ Vancouver, British Columbia. Canada.
- Dasgupta, S.C.L. Mills, and C.R. Fraser. 1993. Ca^{2+} Regulating Mechanism that Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytosis as Determined by Chlortetracycline Analysis. *Mol. Reprod. Dev.*, 40: 233-241.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th Ed.. Lea Febiger. Philadelphia: 440-443.
- Mattioli, M., B. Barboni, P. Lucidi, and E. Seren. 1996. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*, 4: 373-376.

Suhadji. 1995. Pengembangan Bioteknologi Peternakan. Keterkaitan penelitian, pengkajian dan aplikasi. *Prosiding Lokakarya Nasional I. Bioteknologi Peternakan*. Kerjasama antara Kantor Menristek RI dengan Departemen Pertanian RI. Ciawi 23-24 Januari 1995

Susilawati, T., S.B. Sumitro, S. Rahayu, G. Ciptadi, dan N. Isaeni. 1996. Separation of X-Y Chromosome Bearing Sperm in Indonesian Native Bull with Sephadex G-200. *The 13th Congres on Animal Reproduction*. Darling

Harbour Convention Centre. Sidney. June 30-July-4, 1996. 24:3.

Akhir Penelitian Riset Unggulan Terpadu. Universitas Brawijaya, 17-21.

Susilawati, T., S.B. Sumitro, dan H. Sutanto. 1997. Upaya Pembekuan Semen Hasil Sexing serta Penerapannya dalam Inseminasi Buatan pada Sapi untuk Mendapatkan Pedet dengan Jenis Kelamin Sesuai Harapan. *Laporan*

Yanagimachi, R. 1988. Mammalia fertilization. *In*: Knobil, E. and J.D. Neill. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York. p. 138-152.