

## Seleksi Spermatozoa Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi *Gradien Densitas Percoll*

(*SELECTION OF GARUT SHEEP SPERMS USING  
PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION METHOD*)

Heri Sujoko<sup>1</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>2</sup>, Arief Boediono<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian,  
Universitas Palangka Raya Kampus UNPAR Tunjung Nyaho,  
Jl. Yos Sudarso, Kotak Pos 2/PLKUP Palangka Raya 73111,  
Telp/Fax: (0536)32 22664 ; E-mail: [hsujoko@yahoo.com](mailto:hsujoko@yahoo.com)

<sup>2</sup>Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi;

<sup>3</sup>Lab Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,  
Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor.

### ABSTRACT

Preparation of a good quality of sperm is required in order to increase the efficacy of *in vitro* fertilization. One method of a good sperm preparation is the use of Percoll density gradient centrifugation. This study was aimed to determine the optimal combination of speed and time of centrifugation for the sperm preparation with the lowest mortality rate. Fresh semen collected from Garut sheep with the concentration of 2 million cells per ml was used in this study. The experimental design used was a completely randomized factorial design with one control group and sixteen combination of speed and time of centrifugation. They were 1), (1) 200 xg for 5 min; (2) 200 xg for 10 min; (3) 200 xg for 15 min; (4) 200 xg for 20 min; (5) 300 xg for 5 min; (6) 300 xg for 10 min; (7) 300 xg for 15 min; (8) 300 xg for 20 min; (9) 400 xg for 5 min; (10) 400 xg for 10 min; (11) 400 xg for 15 min; (12) 400 xg for 20 min; (13) 500 xg for 5 min; (14) 500 xg for 10 min; (15) 500 xg for 15 min; and (16) 500 xg for 20 min. All of control and treatments combination were replicated for three times. Each control and combined treatment were replicated for three times. The variables observed were the concentration of sperm, the percentage of live sperms, the percentage of progressively motile sperms and the percentage of normal sperm. The data obtained were analyzed by two way analysis of variance (ANOVA) and the differences between treatment groups were subjected for Duncan's Multiple Range Test (DMRT). The best result was obtained using 400 xg for 15 minutes which showed the sperm concentration of  $66.66 \pm 12.22$  millions per ml, the living sperms of  $74.82 \pm 1.53\%$ , the percentage of progressively motile sperm of  $57.56 \pm 8.42\%$  and the percentage of normal sperm of  $86 \pm 1.73\%$ .

Keywords : selection, sperms, centrifugation, percoll

### PENDAHULUAN

Teknologi reproduksi saat ini berkembang sangat pesat (Nazlie *et al.*, 2006). Teknologi tersebut pada awalnya ditujukan untuk peningkatan sifat reproduksi, mulai bergeser ke arah teknologi reproduksi berbantuan (*assisted reproductive technology/ART*) (Henkel dan Schill, 2003). Teknologi reproduksi berbantuan adalah teknik bidang kedokteran untuk membantu proses reproduksi dengan cara mengatasi hambatan bertemunya spermatozoa dan oosit, sehingga memungkinkan terjadinya

konsepsi (Hermawanto dan Hadiwidjaja, 2006). Secara umum ART meliputi beberapa metode, yaitu fertilisasi *in vitro* (*in vitro fertilisation/IVF*), embrio transfer (ET), inseminasi buatan (IB), *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI), mikromanipulasi embrio, *semen sexing*, *genome resource banking* dan *somatic cell nuclear transfer* (SCNT)/cloning (Andrabi dan Maxwell, 2007).

Salah satu ART yang sering dilakukan pada ternak domba adalah IVF. IVF merupakan teknologi produksi embrio pada media di luar tubuh (Jaswandi *et al.*, 2001). Keberhasilan IVF

salah satunya dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa (Morrell, 2006). Kualitas spermatozoa yang dimaksud adalah spermatozoa yang mempunyai daya hidup tinggi, morfologi normal dan motilitas progresif. Motilitas merupakan kemampuan gerak maju individu spermatozoa di dalam lingkungan zat cair. Pergerakan tersebut penting dalam membantu spermatozoa menembus sel-sel pelindung yang mengelilingi sel telur (Herdis *et al.*, 2005). Syarat minimal konsentrasi spermatozoa untuk IVF adalah 1 juta sel/ml, motilitas progresif 40%, spermatozoa hidup 40% dan abnormalitas kurang dari 14% (Kline dan Rath, 2006 ; Ksiazkiewicz *et al.*, 2006). Dalam rangka memenuhi hal tersebut perlu dilakukan seleksi spermatozoa, yaitu memisahkan spermatozoa berkualitas baik dari total populasi.

Metode seleksi spermatozoa yang telah dikenal adalah *simple washing*, *swim up*, teknik migrasi ke samping, sentrifugasi gradien densitas, *migration gravity sedimentation*, *sephadex and glass wool columns*, *albumin column filtration*, *optiprep*, *ixaprep*, *accudenz*, dan *silane-coated silica-based gradient* (Tucker dan Jansen, 2002).

Pada penelitian ini dipilih metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* karena paling banyak digunakan (Mendes *et al.*, 2003) dan telah terbukti lebih efektif serta efisien dibandingkan metode *swim up* (Tucker dan Jansen, 2002). Metode ini dilakukan dengan cara membuat *gradien densitas* dan memisahkan spermatozoa dengan alat sentrifugasi. Permasalahannya adalah berapa kecepatan dan lama sentrifugasi dilakukan, agar daya hidup dan motilitas spermatozoa dapat dipertahankan dan tingkat kerusakan spermatozoa rendah. Penelitian ini bertujuan menentukan kombinasi kecepatan dan waktu sentrifugasi yang optimum untuk memperoleh spermatozoa berkualitas baik.

## METODE PENELITIAN

### Ternak Percobaan

Ternak yang digunakan untuk percobaan adalah seekor pejantan domba garut dengan kondisi sehat, telah dewasa kelamin, berumur sekitar 3 tahun, dan berat badan sekitar 70 kg. Pejantan tersebut ditempatkan di dalam kandang individu. Pakan yang diberikan berupa campuran rumput gajah dan rumput lapangan sebanyak 3 kg/ekor/hari dan konsentrat 700

gram/ekor/hari. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

### Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial. Faktor pertama adalah sentrifugasi spermatozoa dalam *gradien densitas percoll* pada kecepatan 200xg, 300xg, 400xg dan 500xg. Faktor kedua adalah waktu sentrifugasi spermatozoa selama 5 menit, 10 menit, 15 menit dan 20 menit. Sehingga terdapat 16 kombinasi perlakuan. Sebagai pembanding, pada penelitian ini digunakan perlakuan kontrol, yaitu sentrifugasi spermatozoa dalam medium *Brackett-Oliphant* (BO) pada kecepatan 200xg selama 5 menit. Semua perlakuan diulang 3 kali dan setiap ulangan terdiri dari 3 sampel percobaan yang berasal dari 1 kali penampungan semen.

### Penyiapan Medium BO dan Pengenceran Percoll

Medium BO merupakan medium dasar untuk fertilisasi *in vitro*. Pada penelitian ini medium BO diperlukan sebagai pengencer *percoll* 10%, 50%, dan 90%. Di samping itu medium BO digunakan sebagai medium pencuci dan penambah volume semen dalam upaya mendapatkan konsentrasi spermatozoa 200 juta/ml setiap perlakuan. Komposisi medium BO terdiri dari: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NaHCO<sub>3</sub>, glukosa, sodium pyruvat, phenol red, dan antibiotik.

### Penyiapan Semen

Penampungan semen dilakukan dengan menggunakan vagina buatan sebanyak 2 kali per minggu. Setiap kali penampungan, dilakukan evaluasi semen secara makroskopis (volume, konsistensi, warna, dan pH) dan mikroskopis (gerakan massa, motilitas, konsentrasi, spermatozoa hidup, dan spermatozoa normal). Semen yang telah dinyatakan layak kemudian diencerkan dengan medium BO, hingga mendapatkan konsentrasi spermatozoa 200 juta sel/ml yang selanjutnya digunakan untuk tiap-tiap perlakuan (Maxwell *et al.*, 1984).

### Seleksi Spermatozoa dengan Metode *Simple Washing* (Kontrol)

Sebanyak 1ml semen yang telah diencerkan medium BO dengan konsentrasi spermatozoa 200 juta sel/ml diteteskan ke dalam tabung reaksi (ukuran 15ml) yang berisi 6ml medium

BO. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan sentrifugasi pada kecepatan 200xg selama 5 menit. Pelet spermatozoa yang terbentuk dipindahkan ke tabung lain dan dievaluasi kualitasnya.

### **Seleksi Spermatozoa dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll**

*Percoll* yang telah diencerkan dengan medium BO konsentrasi 10%, 50% dan 90% dimasukkan ke dalam sebuah tabung reaksi secara urut mulai konsentrasi 90% (paling bawah), 50% dan 10% (paling atas) masing-masing 2 ml. Sebanyak 1 ml semen yang telah diencerkan dengan medium BO dengan konsentrasi spermatozoa 200 juta sel/ml, diteteskan di atas gradien tersebut. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi sesuai kombinasi perlakuan. Pelet spermatozoa hasil sentrifugasi ditambahkan medium BO (1:3). Kemudian dilakukan pencucian dengan sentrifugasi pada kecepatan 200xg selama 5 menit (Amershambiosciences, 2001). Pelet yang dihasilkan kemudian dievaluasi kualitasnya.

### **Parameter Penelitian**

Parameter yang diamati adalah (1) kualitas semen segar, meliputi: volume, konsistensi, warna, pH, gerakan massa, motilitas, konsentrasi, spermatozoa hidup dan spermatozoa normal; (2) kualitas spermatozoa setelah perlakuan, meliputi: konsentrasi, spermatozoa hidup, motilitas progresif dan spermatozoa normal.

### **Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa**

Pemeriksaan makroskopis semen segar dilakukan menggunakan metode yang telah baku (Toelihere, 1993). Volume dan warna semen diukur dan dilihat langsung pada tabung penampung yang berskala sesaat setelah penampungan semen, konsistensi diperiksa dengan menggoyang-goyangkan tabung berisi semen, dan pH semen diukur dengan kertas lakmus 6,4-8,0.

Berbagai pemeriksaan mikroskopis semen segar mau pun pemeriksaan kualitas spermatozoa setelah perlakuan menggunakan mikroskop cahaya adalah :

#### **a. Pemeriksaan gerakan massa spermatozoa.**

Gerakan massa spermatozoa diamati di atas gelas obyek tanpa gelas penutup dengan pembesaran 100 kali, dengan kriteria : +++

(sangat baik, bila terlihat gelombang besar, banyak, gelap dan tebal); ++ (baik, bila terlihat gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban); + (cukup, bila tidak terlihat gelombang dan hanya gerakan individual aktif progresif); dan N (buruk, bila tidak ada gerakan-gerakan individual).

#### **b. Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa**

Semen diencerkan 200 kali dengan NaCl 3%. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan *haemocytometer* dalam 5 kamar hitung menurut arah diagonal kemudian dikalikan  $10^7$ . Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop pembesaran 400 kali.

#### **c. Pemeriksaan spermatozoa motil progresif setelah perlakuan**

Semen diencerkan 200 kali dengan medium BO. Jumlah spermatozoa motil progresif diperoleh dari perhitungan secara riil (bukan berdasarkan perkiraan), menggunakan *haemocytometer* dalam 5 kamar hitung menurut arah diagonal kemudian dikalikan  $10^7$ . Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop pembesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa motil progresif dihitung dengan pendekatan sebagai berikut : konsentrasi – jumlah spermatozoa tidak bergerak – jumlah spermatozoa bergerak di tempat.

#### **d. Pemeriksaan spermatozoa hidup dan mati**

Pemeriksaan spermatozoa hidup dan mati menggunakan pewarna eosin-negrosin diamati di bawah mikroskop pembesaran 400 kali pada 10 lapang pandang yang berbeda minimal 200 sel. Spermatozoa dinyatakan hidup jika kepala berwarna putih dan spermatozoa mati jika seluruh atau sebagian permukaan kepala berwarna merah.

#### **e. Pemeriksaan spermatozoa normal**

Pemeriksaan spermatozoa normal menggunakan pewarna eosin 2%. Preparat diteteskan minyak immersi dan diamati di bawah mikroskop pembesaran 1000 kali pada 10 lapang pandang yang berbeda, minimal 200 sel.

### **Analisis Data**

Data dianalisis dengan uji sidik ragam, jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda duncan pada taraf signifikansi 5% (Gomez dan Gomez, 1995). Pengolahan data menggunakan *software SPSS 15.0 for windows* (Uyanto, 2006).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Semen Segar Domba garut

Rataan kualitas semen segar hasil penampungan sebanyak 48 kali, dari seekor domba garut tertera pada Tabel 1. Hasil evaluasi, menunjukkan bahwa semen domba garut yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kategori baik dan layak digunakan untuk percobaan lebih lanjut sesuai persyaratan yang ditetapkan menurut Evans dan Maxwell (1987) yaitu gerakan massa +++, motilitas lebih besar dari 70% dan spermatozoa normal lebih banyak dari 85%.

Volume semen domba garut pada penelitian ini diperoleh rata-rata  $0,98 \pm 0,16$  ml per ejakulat, lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian Boediono *et al.*, (2004) yang memperoleh rata-rata  $0,7 \pm 0,1$  ml. Perbedaan volume semen tersebut selain disebabkan oleh perbedaan individu ternak, juga disebabkan oleh frekuensi ejakulasi, bangsa ternak, umur, musim, nutrisi, libido, dan kondisi ternak itu sendiri (Everett dan Bean, 1982).

Warna, konsistensi, dan konsentrasi mempunyai hubungan yang erat satu sama lain. Semakin kental semen yang dihasilkan oleh ternak, maka konsentrasi semakin tinggi dan warna akan semakin pekat. Rataan warna semen domba garut pada penelitian ini adalah krem dengan rata-rata konsistensi kental dan rata-rata konsentrasi  $3528,85 \pm 777,11$  juta/ml (Tabel 1). Rizal *et al.*, (2003) melaporkan rata-rata warna semen domba garut adalah krem, rata-rata konsistensi kental, dan rata-rata konsentrasi spermatozoa  $3224 \pm 636,35$  juta/ml. Perbedaan ini diduga disebabkan oleh variasi individu hewan percobaan, di antaranya umur dan bobot badan.

Derajat keasaman plasma semen sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin tinggi atau semakin rendah pH semen dari keadaan normal akan menyebabkan spermatozoa lebih cepat mengalami kematian. Hasil pengukuran pH semen domba garut pada penelitian ini diperoleh rata-rata  $6,73 \pm 0,24$  (Tabel 1), lebih rendah dibanding hasil penelitian Rizal *et al.*, (2003) yang memperoleh rata-rata  $7,07 \pm 0,11$ . Menurut Toelihere (1985) spermatozoa sangat aktif dan tahan hidup lama pada pH sekitar 7,0. Menurut Evans dan Maxwell (1987) variasi pH disebabkan oleh variasi produksi plasma semen oleh kelenjar kelamin aksesoris. Kelenjar kelamin aksesoris bertanggung jawab terhadap

Tabel 1 Rataan kualitas semen segar domba garut

Parameter	Rataan $\pm$ SD
Volume (ml)	$0,98 \pm 0,16$
Konsistensi	Kental
Warna	Krem
pH	$6,73 \pm 0,24$
Gerakan massa	+++
Konsentrasi (juta/ml)	$3528,85 \pm 777,11$
Spermatozoa hidup (%)	$88,48 \pm 2,68$
Motilitas (%)	$79,62 \pm 3,98$
Spermatozoa normal (%)	$92,16 \pm 3,61$

kapasitas penyangga semen. Sistem penyangga semen berperan melindungi spermatozoa dari perubahan pH secara tiba-tiba yang dapat merusak daya hidup sel spermatozoa.

Ciri utama spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai gerakan massa dan motilitas dengan daya gerak maju yang progresif. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, maka gerakan massa akan semakin baik. Rataan gerakan massa semen domba garut pada penelitian ini adalah +++ dan rata-rata motilitas  $79,62 \pm 3,98\%$  (Tabel 1). Beberapa peneliti melaporkan bahwa rata-rata persentase motilitas spermatozoa domba garut adalah  $74,17 \pm 4,92\%$  (Herdis *et al.*, 2002),  $76,67\% \pm 2,36$  (Rizal *et al.*, 2003) dan  $75,0 \pm 3,2\%$  (Boediono *et al.*, 2004). Perbedaan tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan kuantitas dan kualitas pakan yang diberikan. Pemberian pakan dengan kuantitas dan kualitas rendah dapat menghambat fungsi reproduksi melalui pengaruhnya terhadap sekresi hormon gonadotropin kelenjar adenohipofisa, dalam hal tersebut tubuli seminiferi kurang dipengaruhi dibandingkan dengan sel-sel interstitial yang memproduksi testosteron.

Penilaian persentase spermatozoa hidup dan mati bertujuan untuk mengetahui viabilitas membran spermatozoa. Teknik pewarnaan pada penelitian ini menggunakan pewarna eosin-negrosin. Menurut BjoErndahl *et al.*, (2003) teknik tersebut sangat mudah dan dapat dipercaya untuk menandai spermatozoa hidup dan mati. Eosin berfungsi sebagai penanda sel-sel mati, sedangkan negrosin memberikan warna pada latar belakang. Persentase spermatozoa hidup semen domba garut pada penelitian ini diperoleh rata-rata  $88,48\% \pm 2,68$

Tabel 2 Rataan konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa hidup, spermatozoa motil progresif, dan persentase spermatozoa normal domba garut hasil sentrifugasi *gradien densitas percoll* (Konsentrasi spermatozoa sebelum perlakuan adalah  $200 \times 10^6/\text{ml}$ )

Kecepatan Sentrifugasi (xg)	Waktu Sentrifugasi (menit)			
	5	10	15	20
<b>Rataan Konsentrasi spermatozoa (<math>10^6/\text{ml}</math>)</b>				
200	24,66±3,06 <sup>a-A</sup>	43,34±2,3 <sup>b-A</sup>	53,34±3,06 <sup>c-A</sup>	64,66±5,04 <sup>d-A</sup>
300	38,00±4,00 <sup>a-B</sup>	50,66±2,3 <sup>b-B</sup>	61,34±5,04 <sup>c-A</sup>	78,00±6,00 <sup>d-B</sup>
400	48,66±3,06 <sup>a-C</sup>	55,34±4,16 <sup>ab-B</sup>	66,66±12,22 <sup>b-A</sup>	86,00±5,30 <sup>c-BC</sup>
500	51,34±3,06 <sup>a-C</sup>	56,66±5,04 <sup>a-B</sup>	84,00±11,14 <sup>b-B</sup>	95,34±4,16 <sup>b-C</sup>
<b>Persentase spermatozoa hidup</b>				
200	14,79±5,60 <sup>a-A</sup>	19,22±2,40 <sup>ab-A</sup>	24,98±4,19 <sup>b-A</sup>	17,20±3,93 <sup>ab-A</sup>
300	35,72±9,02 <sup>b-BC</sup>	48,77±4,07 <sup>c-B</sup>	58,91±4,03 <sup>c-B</sup>	22,98±4,75 <sup>a-A</sup>
400	46,44±3,30 <sup>a-C</sup>	71,59±2,12 <sup>c-C</sup>	74,82±1,53 <sup>c-C</sup>	63,25±1,97 <sup>b-B</sup>
500	25,34±3,64 <sup>b-AB</sup>	52,92±3,75 <sup>c-B</sup>	56,47±3,42 <sup>c-B</sup>	17,42±4,22 <sup>a-A</sup>
<b>Rataan spermatozoa motil progresif</b>				
200	15,00±13,23 <sup>a-A</sup>	24,34±3,67 <sup>ab-A</sup>	34,89±9,95 <sup>b-A</sup>	11,79±3,11 <sup>a-A</sup>
300	23,19±26,12 <sup>ab-AB</sup>	44,54±1,42 <sup>b-C</sup>	48,04±5,64 <sup>b-AB</sup>	15,51±7,53 <sup>a-A</sup>
400	48,48±2,63 <sup>b-B</sup>	51,28±2,22 <sup>b-D</sup>	57,56±8,42 <sup>b-B</sup>	34,16±9,30 <sup>a-B</sup>
500	25,67±2,27 <sup>b-AB</sup>	34,46±0,14 <sup>c-B</sup>	37,01±1,21 <sup>c-A</sup>	11,46±2,99 <sup>a-A</sup>
<b>Rataan spermatozoa normal</b>				
200	26±2,65 <sup>b-A</sup>	29±3,00 <sup>b-A</sup>	35±3,46 <sup>c-A</sup>	15±1,00 <sup>a-A</sup>
300	55±1,00 <sup>b-C</sup>	74±1,00 <sup>c-B</sup>	81±1,73 <sup>d-C</sup>	46±1,00 <sup>a-C</sup>
400	71±1,00 <sup>a-D</sup>	78±2,00 <sup>b-C</sup>	86±1,73 <sup>d-D</sup>	82±2,00 <sup>c-D</sup>
500	43±3,61 <sup>b-B</sup>	72±2,00 <sup>c-B</sup>	75±1,00 <sup>c-B</sup>	31±1,73 <sup>a-B</sup>

Keterangan : Nilai dengan *superskrip* berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (a-d, P<0.05). Nilai dengan *superskrip* berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (A-C, P<0.05)

(Tabel 1). Beberapa peneliti melaporkan bahwa persentase spermatozoa hidup domba bervariasi. Herdis *et al.*, (2002) melaporkan rata-rata spermatozoa hidup domba garut 91,83±2,00%. Sedangkan menurut Rizal *et al.*, (2003) 87,33%±3,40 dan Boediono *et al.*, (2004) 91,5±3,1%. Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah setelah pewarnaan dengan eosin negrosin.

Bentuk morfologi sel spermatozoa yang dilaporkan Dally *et al.*, (2000) dalam Hafez dan Hafez (2000) berpengaruh terhadap pembuahan, jika jumlah abnormalitas spermatozoa terlalu tinggi maka akan menurunkan fertilitasnya. Persentase spermatozoa normal semen domba garut pada penelitian ini diperoleh rata-rata 92,16±3,61% (Tabel 1) atau rata-rata abnormalitas spermatozoa 7,84%. Abnormalitas pada beberapa

ternak bervariasi. Menurut laporan Garner dan Hafez (2000) dalam Hafez dan Hafez (2000), bahwa abnormalitas spermatozoa domba berkisar antara 5-20%; sapi 5-35%; babi 10-30%; kuda 10-40%, dan ayam 10-15%. Beberapa peneliti melaporkan bahwa rata-rata abnormalitas spermatozoa domba garut sebesar 3,17±0,41% (Herdis *et al.*, 2002), 5,47±1,75% (Rizal *et al.*, 2003), dan 1,8±0,8% (Boediono *et al.*, 2004). Berdasarkan hasil pengamatan, abnormalitas primer yang banyak didapatkan adalah kepala terlampau kecil (*microcephalic*), sedangkan abnormalitas sekunder yang banyak ditemukan adalah patahan pada ekor.

**Kualitas Spermatozoa Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll**

Hasil pengujian statistika menunjukkan bahwa faktor kecepatan dan waktu sentrifugasi

Tabel 6 Perbandingan rata-rata kualitas spermatozoa semen segar, kontrol, dan metode sentrifugasi gradien densitas percoll

Parameter	Rataan kualitas spermatozoa		
	Semen segar	Metode <i>simple washing</i> (Kontrol)	Metode sentrifugasi gradien densitas percoll 400 xg 15 menit
Konsentrasi (x10 <sup>6</sup> /ml)	200,00 <sup>a</sup>	34,66 <sup>b</sup>	66,66 <sup>c</sup>
Spermatozoa hidup (%)	88,48 <sup>a</sup>	73,01 <sup>b</sup>	74,82 <sup>b</sup>
Spermatozoa motil progresif (%)	79,62 <sup>a</sup>	50,89 <sup>b</sup>	57,56 <sup>b</sup>
Spermatozoa normal (%)	92,16 <sup>a</sup>	85,33 <sup>b</sup>	86,00 <sup>b</sup>

Keterangan : Nilai dengan *superskrip* berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0.05)

tidak berpengaruh nyata ( $p>0.05$ ) terhadap konsentrasi spermatozoa dan persentase spermatozoa motil progresif. Namun, berpengaruh nyata ( $p<0.05$ ) terhadap persentase spermatozoa hidup dan persentase spermatozoa normal. Data menunjukkan semakin tinggi kecepatan dan waktu sentrifugasi, konsentrasi spermatozoa makin meningkat ( $r=0.97$ ) (Tabel 2).

Meningkatnya konsentrasi tersebut juga diikuti dengan peningkatan persentase spermatozoa hidup, persentase spermatozoa motil progresif dan persentase spermatozoa normal (Tabel 2). Peningkatan kualitas ketiga parameter tersebut, hanya sampai pada kecepatan sentrifugasi 400 xg selama 15 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan lebih dari 400 xg 15 menit, diperoleh persentase spermatozoa hidup, persentase spermatozoa motil progresif, dan persentase spermatozoa normal menurun.

Peningkatan kualitas spermatozoa ketiga parameter hanya sampai pada kecepatan sentrifugasi 400 xg selama 15 menit ini disebabkan (1) perbedaan perlakuan; (2) akibat proses pemisahan *gradien densitas percoll*; (3) akibat perbedaan viskositas dan osmolaritas *gradien densitas percoll*.

Peningkatan rata-rata konsentrasi spermatozoa (Tabel 2) disebabkan oleh pengaruh perbedaan perlakuan kecepatan dan waktu sentrifugasi. Perbedaan tersebut mengakibatkan pengaruh gaya sentrifugal dan sentripetal terhadap spermatozoa menjadi berbeda. Proses sentrifugasi memaksa spermatozoa untuk bergerak ke tengah tabung, akibat adanya gaya sentripetal. Meningkatnya kecepatan dan waktu sentrifugasi menyebabkan semakin banyak spermatozoa yang tertarik ke pusat atau

mengumpul di tengah-tengah tabung reaksi dan akhirnya mengendap ke dasar tabung reaksi, yang berarti konsentrasi spermatozoa semakin meningkat. Hal tersebut dibuktikan pada perlakuan sentrifugasi tertinggi, 500xg selama 20 menit, rata-rata konsentrasi spermatozoa diperoleh 95,34±4,16 juta/ml, paling tinggi dibandingkan perlakuan yang lain.

Sebaliknya sentrifugasi dengan kecepatan dan waktu lambat, keberadaan spermatozoa dalam tabung menyebar dan menjauh dari pusat tabung reaksi akibat gaya sentrifugal lebih besar dibanding sentripetal, sehingga spermatozoa tidak banyak mencapai ke dasar tabung reaksi, menyebabkan konsentrasi spermatozoa yang mengendap menjadi rendah. Hal ini dibuktikan pada perlakuan sentrifugasi terendah, 200 xg selama 5 menit, rata-rata konsentrasi spermatozoa diperoleh 24,66±3,06 juta/ml, paling rendah dibandingkan perlakuan yang lain.

Makin tinggi kecepatan dan waktu sentrifugasi mengakibatkan gesekan antar spermatozoa atau spermatozoa dengan medium mau pun dinding tabung reaksi makin besar. Hal tersebut menyebabkan persentase abnormalitas dan kerusakan membran spermatozoa meningkat. Kerusakan membran spermatozoa dapat menyebabkan proses metabolisme terganggu dan mempengaruhi daya hidup dan motilitas spermatozoa. Hal tersebut dibuktikan dengan sentrifugasi kecepatan tinggi lebih dari 400xg selama 15 menit, menyebabkan persentase spermatozoa hidup, motilitas progresif, dan spermatozoa normal menurun. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa sentrifugasi dengan kecepatan rendah 200 xg selama 5 menit dan kecepatan tinggi 500xg

selama 20 menit menghasilkan persentase spermatozoa normal rendah. Abnormalitas spermatozoa yang terjadi antara lain: kepala terpisah dengan ekor, ekor patah dan melengkung.

Perlakuan 200xg selama 5 menit membuat rata-rata persentase spermatozoa normal sebesar  $26 \pm 2,65\%$  dan perlakuan 500xg selama 20 menit sebesar  $31 \pm 1,73\%$  (Tabel 2). Perlakuan sentrifugasi 400xg selama 15 menit merupakan kombinasi optimum karena diperoleh kualitas spermatozoa tertinggi, yaitu spermatozoa mampu mempertahankan daya hidup, motilitas progresif, dan spermatozoa normal. Hal tersebut menunjukkan spermatozoa mampu mempertahankan efek sentrifugasi mencapai maksimal. Jika sentrifugasi dilakukan melebihi 400xg 15 menit maka kualitas spermatozoa menurun.

Semen normal mengandung sejumlah spermatozoa yang bergerak progresif, mati, hidup tetapi imotil atau motilitasnya lemah (Campbell *et al.*, 2003) serta beberapa material asing seperti partikel-partikel pemuai dan sel-sel bakteri (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1997). Semen dalam *gradien densitas percoll* yang disentrifugasi membuat spermatozoa terpisah dari plasma semen mau pun material asing. Proses pemisahan tersebut diduga akibat perbedaan berat jenis dan motilitas progresif spermatozoa. Partikel-partikel dipisahkan menurut ukuran atau faktor-faktor lain yang mempengaruhi mobilitasnya (Giancoli, 2001). Menurut Salisbury dan Vandemark (1985) berat jenis spermatozoa berkisar antara 1,24-1,34 dan berat jenis plasma semen 1,005. Spermatozoa mati diduga mempunyai berat jenis lebih rendah dibandingkan spermatozoa hidup, akibat keluarnya suspensi dari dalam sel karena membran sel telah rusak. Jika dilakukan sentrifugasi maka spermatozoa mati akan terapung atau berada di atas permukaan tabung reaksi, sedangkan spermatozoa hidup mempunyai berat jenis lebih besar sehingga cenderung turun ke dasar tabung.

Sejumlah spermatozoa mati, abnormal, atau imotil akan lebih banyak berada pada *gradien densitas percoll* konsentrasi rendah akibat ketidakmampuannya menembus *gradien densitas percoll* yang lebih pekat (konsentrasi tinggi), sedangkan spermatozoa dengan motilitas progresif, mempunyai kemampuan untuk menembus *gradien densitas percoll* dengan konsentrasi tinggi. Meningkatnya rataan persentase spermatozoa hidup dan persentase

spermatozoa motil progresif (Tabel 2) berkaitan dengan terpisahnya spermatozoa dengan bakteri patogen (Morrell, 2006) selama sentrifugasi *gradien densitas percoll*. Kehadiran bakteri patogen tersebut dapat mempengaruhi secara langsung mau pun tidak langsung daya hidup dan motilitas spermatozoa.

Cairan *percoll* memiliki gesekan internal yang disebabkan oleh gaya kohesi antar molekul. Cairan yang berbeda memiliki besar viskositas yang berbeda pula (Giancoli, 2001). *Percoll* mempunyai viskositas  $10 \pm 5$  centipois pada suhu  $20^\circ\text{C}$  (Amershambiosciences, 2003), sedangkan rata-rata viskositas semen sebesar 2,5 atau kisaran 1,15-7,15 centipois, rataan kekentalan plasma yang telah disentrifugasi sebesar 1,3 atau kisaran 1,0-1,85 centipois (Salisbury dan Van Demark, 1985). Makin besar viskositas *gradien*, gaya gesek sel-sel spermatozoa terhadap *gradien* makin besar. Makin besar kecepatan dan waktu sentrifugasi menyebabkan tingginya gesekan spermatozoa dengan *gradien densitas percoll*. Akibatnya ikatan protein dan lipid membran goyah dan mengganggu permeabilitas membran spermatozoa. Keadaan tersebut menyebabkan rataan persentase spermatozoa hidup dan normal menurun. Hal tersebut dibuktikan jika sentrifugasi dilakukan dengan kecepatan tinggi, di atas 400xg selama 15 menit rataan persentase spermatozoa hidup dan spermatozoa normal menurun akibat ketidakmampuan spermatozoa mempertahankan pengaruh gaya gesek tersebut. Pada perlakuan 400xg selama 15 menit kemampuan spermatozoa dalam mempertahankan gaya gesek mencapai maksimal.

Hasil pengukuran, menunjukkan rataan osmolaritas *percoll* sebelum sentrifugasi adalah sebagai berikut: *percoll* 10% ( $237 \text{ mOs/kg H}_2\text{O}$ ), *percoll* 50% ( $142 \text{ mOs/kg H}_2\text{O}$ ), dan *percoll* 90% ( $38 \text{ mOs/kg H}_2\text{O}$ ). Sedangkan rataan osmolaritas *gradien densitas percoll* setelah sentrifugasi  $192 \text{ mOs/kg H}_2\text{O}$  lebih rendah dibandingkan dengan osmolaritas spermatozoa normal yaitu berkisar  $280-330 \text{ mOs/kg H}_2\text{O}$ . Kondisi medium yang tidak isotonis tersebut mengakibatkan terjadinya peristiwa perpindahan cairan dari medium *percoll* ke dalam sel-sel spermatozoa melalui membran semipermeabel, sehingga menyebabkan kondisi sel spermatozoa menggelembung akibat konsentrasi cairan meningkat. Meskipun sifat *percoll* sendiri tidak menembus membran sel (Amershambiosciences, 2003) namun, dalam *gradien densitas percoll* terdapat cairan medium BO. Kondisi medium

yang mempunyai osmolaritas berbeda dengan spermatozoa tersebut diduga memberi kontribusi terhadap meningkatnya kematian spermatozoa setelah sentrifugasi *gradien densitas percoll*. Meskipun demikian, pengaruh tersebut bisa diabaikan, dengan melakukan pengamatan kualitas spermatozoa dilakukan secepat mungkin, dibawah 30 menit. Pada penelitian ini diketahui bahwa perlakuan 400xg selama 15 menit merupakan kombinasi kecepatan dan waktu sentrifugasi optimum, karena diperoleh kualitas spermatozoa maksimum dengan tingkat kematian dan kerusakan spermatozoa rendah.

#### **Efektifitas Metode Sentrifugasi *Gradien Densitas Percoll***

Ditinjau dari aspek kuantitatif, seleksi spermatozoa dengan menggunakan metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* lebih efektif dan efisien dibandingkan dengan metode *simple washing* (kontrol). Rataan kualitas spermatozoa hasil seleksi metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* (perlakuan 400xg selama 15 menit) nilainya lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol, meskipun secara statistika rata-rata spermatozoa hidup, spermatozoa motil progresif, dan spermatozoa normal hasil seleksi metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* perlakuan 400xg selama 15 menit tidak berbeda nyata ( $P > 0.05$ ) dibandingkan kontrol (Tabel 3).

Jika dibandingkan dengan metode sentrifugasi *gradien densitas percoll*, perlakuan kontrol lebih sederhana karena hanya menggunakan satu lapisan atau satu *gradien*, namun perlakuan tersebut kurang efektif untuk memperoleh spermatozoa berkualitas, karena spermatozoa hasil seleksi banyak mengandung komponen plasma semen seperti reruntuhan (debris) sel-sel epitel. Seleksi spermatozoa dengan metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* 10%, 50%, dan 90% lebih efektif dan efisien karena secara riil dapat diperoleh spermatozoa berkualitas lebih banyak. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa *gradien densitas percoll* 10%, 50%, dan 90% efektif sebagai alat filtrasi spermatozoa secara bertahap, untuk memisahkan spermatozoa dari plasma semen, debris, dan sel-sel epitel. Spermatozoa hasil seleksi dengan metode tersebut lebih bersih dibandingkan dengan perlakuan kontrol.

## **SIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa seleksi spermatozoa dengan metode sentrifugasi *gradien densitas percoll* menggunakan kombinasi kecepatan dan waktu sentrifugasi 400xg 15 menit merupakan kombinasi optimum karena diperoleh konsentrasi spermatozoa tinggi, persentase spermatozoa hidup tertinggi, persentase spermatozoa motil progresif tertinggi, dan persentase spermatozoa normal tertinggi.

## **SARAN**

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan kualitas spermatozoa hasil sentrifugasi *gradien densitas percoll* dengan kemampuan fertilisasi, dan perkembangan embrio *in vitro* serta kajian kualitas spermatozoa semen beku pasca sentrifugasi *gradien densitas percoll*.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan dana dari BPPS 2006 dan Beasiswa Penelitian Unggulan Program P3SWOT Depdiknas RI Tahun 2007, Lab. Unit Rehabilitasi Reproduksi, dan Lab. Embriologi FKH IPB sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Andrabi SMH, Maxwell WMC. 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. (Review). *Anim Reprod Sci.* 99: 223-243.
- Amershambiosciences. 2001. *Percoll Methodology and Applications*. Back To Collection 18-1115-69. Edition AC. Uppsala, Sweden. <http://www.Amershambiosciences.com>. Pp: 1-84 [26 Nov 2007].
- Amershambiosciences. 2003. *Product Information. Percoll Density Marker Bead Kit for Calibration of Percoll Density Gradients*. SIGMA. <http://www.sigmaaldrich.com>. Pp: 1-4 [26 Nov 2007].