

Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan *Cauda Epididymal Plasma-2* Ditambahkan Kuning Telur

*(MEMBRANE OF SPERM FOLLOWING GRADIENT ALBUMIN SEXING USING
ANDROMED AND CEP-2 SUPPLEMENTED WITH EGG YOLK)*

Rita Fitria Purwoistri¹, Trinil Susilawati², Sri Rahayu¹

¹ Laboratorium Biologi Seluler Molekuler Jurusan Biologi,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,

² Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang 65145
E-mail: pritafitria@ymail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas membran spermatozoa setelah seksing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan *Cauda Epididymal Plasma-2* (CEP-2) ditambah kuning telur 10%. Pengamatan membran spermatozoa meliputi integritas membran, spermatozoa yang belum terkapasitasi, terkapasitasi, dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom. Gradien albumin dibuat dengan cara mencampur putih telur dengan pengencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10% sehingga menghasilkan konsentrasi putih telur 10%, 30%, dan 50%. Pengamatan integritas membran menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST), pengamatan spermatozoa yang belum terkapasitasi, terkapasitasi, dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom menggunakan pewarna fluoresen *Chlortetracycline* (CTC). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer andromed menghasilkan spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, spermatozoa yang belum terkapasitasi, terkapasitasi, dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom sama seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mengurangi penurunan jumlah spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa yang belum terkapasitasi, sedangkan spermatozoa terkapasitasi dan spermatozoa yang telah mengalami reaksi akrosom dijaga tetap rendah.

Kata kunci : andromed, CEP-2, membran spermatozoa, *sexing*

ABSTRACT

The objective of this study was to determine sperm membrane stability after sexing with gradient albumin (egg white) using andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk. The observations of sperm membrane included membrane integrity, uncapacitated, capacitated and acrosome reacted. Albumin gradient was made by mixing egg white with andromed or CEP-2 supplemented with 10% egg yolk resulting in a concentration of egg whites 10%, 30% and 50%. Membrane integrity was observed using HOST (Hypoosmotic Swelling Test), while uncapacitated, capacitated and acrosome reacted sperm were observed using CTC (Chlortetracycline) staining. The results showed that both andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk could protect membrane integrity, uncapacitated, capacitated and acrosome reacted sperm. Andromed and CEP-2 supplement with 10% egg yolk could reduce the damage of membrane integrity and uncapacitated sperm, whereas capacitated and acrosome reacted sperm could be kept low.

Keywords: andromed, CEP-2, sperm membrane, *sexing*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan *sexing* atau pemisahan spermatozoa X dan Y merupakan pilihan tepat untuk mendukung peran Inseminasi Buatan dalam rangka meningkatkan efisiensi usaha peternakan. Berbagai metode *sexing* yang telah dilakukan antara lain metode sedimentasi, *albumin column*, sentrifugasi gradien densitas *percoll*, *electrophoresis*, *H-Y antigen*, *flow cytometry*, dan *filtrasi* dengan *sephadex column* (Hafez dan Hafez, 2000).

Metode *sexing* yang mudah diaplikasikan yaitu separasi dengan albumin (Hafez dan Hafez, 2000). *Sexing* dengan albumin putih telur didasarkan pada perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y dengan membuat medium yang berbeda konsentrasinya. Pencucian spermatozoa dengan cara sentrifugasi pada proses *sexing* menyebabkan penurunan jumlah spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (Afiati, 2004; Saili *et al.*, 2000).

Sexing memerlukan pengencer yang mampu melindungi dan menyediakan lingkungan yang optimal bagi spermatozoa, agar kualitas spermatozoa hasil *sexing* dapat dipertahankan tetap baik (Susilawati *et al.*, 2002). Andromed merupakan salah satu jenis pengencer yang baik untuk semen beku dan cair. Andromed mengandung lesitin nabati yang berfungsi melindungi membran plasma spermatozoa (Aires *et al.*, 2003) sedangkan pengencer *Cauda Epididymal Plasma 2* (CEP-2) memiliki komposisi mirip dengan cairan kauda epididimis sapi (Verberckmoes *et al.*, 2004). Kuning telur 10% yang ditambahkan dalam CEP-2 berperan menyediakan sumber energi serta melindungi dan mempertahankan integritas membran spermatozoa. Kuning telur juga membantu mencegah hipermotilitas dan kapasitas dini spermatozoa (Susilawati, 2002; Delgado *et al.*, 2009). Bahan-bahan yang terkandung dalam andromed dan CEP-2 diharapkan dapat melindungi membran plasma spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa setelah *sexing* dapat dipertahankan tetap baik.

Harga pengencer andromed relatif mahal dan merupakan produk impor, sehingga diperlukan usaha mencari pengencer alternatif. Pengencer alternatif diharapkan lebih menguntungkan daripada pengencer andromed, yaitu dengan harga relatif murah, mudah diperoleh, dan dapat menjaga kualitas spermatozoa.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh *sexing* dengan albumin putih telur menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% terhadap membran spermatozoa. Membran spermatozoa yang diamati meliputi spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, spermatozoa yang belum terkapasitasi, terkapasitasi dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom.

METODE PENELITIAN

Sampel Semen

Sampel semen berasal dari sapi *limousine* yang dipelihara di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Malang. Frekuensi penampungan semen satu minggu dua kali menggunakan vagina buatan. Semen yang digunakan dipersyaratkan memiliki motilitas individu minimal 70% dan motilitas masa ++.

Pembuatan Pengencer

Pengencer andromed (SIGMA), dibuat dengan cara melarutkan andromed ke dalam *aquabidest* dengan perbandingan 1:4. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dikembangkan oleh Verberckmoes *et al.*, (2004) dibuat dengan cara melarutkan bahan-bahan: NaCl 15 mmol/L, KCl 7 mmol/L, CaCl₂(H₂O)₂ 3 mmol/L, MgCl₂(H₂O)₆ 4 mmol/L, NaHCO₃ 11,9 mmol/L, NaH₂PO₄ 8 mmol/L, KH₂PO₄ 20 mmol/L, Fruktosa 55 mmol/L, Sorbitol 1 g/L, BSA 2 g/L, Tris 133,7 mmol/L, gentamicin-S 0,05 g/L, lalu ditambahkan kuning telur 10% dan, asam sitrat 42 mmol/L. Osmolaritas pengencer sebesar 320 mOsm, dengan pH 6,6.

Seksing Spermatozoa

Gradien albumin dibuat dengan cara mencampur putih telur dengan larutan andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10%, sehingga menghasilkan konsentrasi putih telur 10%, 30%, dan 50%. Gradien disusun mulai dari konsentrasi putih telur 50%, 30%, dan 10% dengan volume masing-masing 1,5 mL. Semen diencerkan dengan andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10% (perbandingan 1:1), kemudian diambil 1 mL untuk dimasukkan ke dalam gradien dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang. Kemudian dilakukan pencucian dengan cara mengambil 1 mL semen pada lapisan atas dan lapisan bawah,

masing-masing dimasukkan ke dalam 3 mL pegencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang 2 mL (Susilawati, 2003), kemudian dilakukan pengamatan membran spermatozoa.

Pengamatan Integritas Membran Spermatozoa

Integritas membran spermatozoa diuji menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Sejumlah 100 µL semen dimasukkan ke dalam 1 mL larutan hipoosmotik (0,31 g Natrium sitrat dan 0,565 g fruktosa dilarutkan dalam 50 mL aquades), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya dibuat tetesan pada *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* sebelum dilakukan pengamatan dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Spermatozoa dengan membran normal (integritas membran baik) ditandai dengan ekornya melingkar pada bagian ujung, sedangkan spermatozoa dengan membran tidak normal (integritas membran buruk) ditandai dengan ekor lurus (Jayendran *et al.*, 1984; Correa dan Zavos, 1994).

Pengamatan Spermatozoa yang Belum Terkapasitasi, Terkapasitasi, dan Sudah Mengalami Reaksi akrosom

Spermatozoa yang belum terkapasitasi, terkapasitasi, dan yang sudah mengalami reaksi akrosom diamati menggunakan pewarna fluoresen CTC (*Chlortetracycline*). Semen sebanyak 100 mL ditambahkan 100 mL pewarna CTC kemudian dicampur secara lembut dan ditambahkan 8 mL CTC *fixative*. Setelah dicampur secara lembut, kemudian diambil sebanyak 10 mL dan ditempatkan pada kaca objek, kemudian ditambahkan 10 mL DABCO dan dicampur, lalu ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan dengan Mikroskop *Epi-fluoresence* menggunakan filter UV-2A dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa belum terkapasitasi ditandai dengan seluruh kepala berwarna terang. Spermatozoa terkapasitasi ditandai dengan setengah bagian atas kepala berwarna terang. Spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom ditandai adanya bentukan cincin berwarna terang melingkar pada bagian tengah kepala (Fraser *et al.*, 1995; Singh *et al.*, 2001).

Analisis Data

Data yang berbentuk persentase ditransformasi *arcsin* atau transformasi akar kuadrat. Analisis data menggunakan uji t berpasangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Rataan kualitas semen segar disajikan pada Tabel 1. Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar menunjukkan pH 7 dengan warna putih kekuningan. Menurut Garner dan Hafez (2008) rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4-7,8 dan dengan warna putih kekuningan (Pratiwi *et al.*, 2006).

Hasil pemeriksaan mikroskopis (Tabel 1) menunjukkan motilitas massa ++ dan motilitas individu 70%. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Rahmah (2007) yang melaporkan bahwa sapi limousine memiliki motilitas massa ++ dan motilitas individu 71,75%. Viabilitas spermatozoa semen segar yang diperoleh pada penelitian ini adalah 95,12±1,42%. Nilai tersebut tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Pratiwi *et al.*, (2006) yang melaporkan bahwa viabilitas spermatozoa semen segar sapi peranakan ongole (PO) sebesar 93,5±2,1%. Abnormalitas spermatozoa (5,28±3,46%) yang diperoleh pada penelitian ini tergolong rendah karena kurang dari 20% (Hafez dan Hafez, 2000). Konsentrasi spermatozoa semen segar (1432,50±450,80×10⁶/mL) masih tergolong normal, karena menurut Garner dan Hafez (2000) konsentrasi spermatozoa sapi

Tabel 1. Ratan kualitas semen segar sapi limousin

Parameter	Rataan ± SD
pH	7,00 ± 0,00
Warna	Putih kekuningan
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	70,00 ± 0,00
Viabilitas (%)	95,12 ± 1,42
Abnormalitas (%)	5,28 ± 3,46
Konsentrasi (10 ⁶ /mL)	1432,50 ± 450,80
Integritas membran (%)	88,59 ± 3,74
Belum kapasitasi (%)	87,55 ± 3,79
Kapasitasi (%)	9,37 ± 2,86
Reaksi akrosom (%)	3,08 ± 1,01

adalah $8-20 \times 10^8/\text{mL}$, dengan jumlah spermatozoa per ejakulasi $5-15 \times 10^9$.

Hasil pemeriksaan fisiologi semen segar (Tabel 1) menunjukkan bahwa spermatozoa yang memiliki integritas membran baik $88,87 \pm 3,11\%$. Menurut Sali *et al.*, (2000) jika motilitas tinggi dan gerakan massa mempunyai nilai ++ atau +++ maka nilai integritas membran spermatozoa akan tinggi pula, spermatozoa semen segar memiliki integritas membran baik sebesar $88,1 \pm 3,74\%$. Spermatozoa yang belum terkapasitasi $87,55 \pm 3,79\%$, terkapasitasi $9,37 \pm 2,86\%$, dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom $3,08 \pm 1,01\%$. Hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa semen segar yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kualitas baik, karena spermatozoa yang belum terkapasitasi terdapat dalam jumlah yang banyak, artinya secara fisiologi spermatozoa berada dalam kondisi normal. Penelitian yang dilakukan oleh Rahmah (2007) melaporkan hasil yang tidak jauh berbeda yaitu spermatozoa yang belum terkapasitasi $82,5 \pm 17,47\%$, terkapasitasi $42,35 \pm 25,81\%$ dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom $43,85 \pm 17,20\%$.

Kualitas Spermatozoa Hasil Seksing

Kualitas spermatozoa setelah seksing disajikan pada Tabel 2. Hasil analisis statistik dengan uji t berpasangan, menunjukkan bahwa pengencer andromed menghasilkan spermatozoa memiliki integritas membran baik, spermatozoa yang belum terkapasitasi, terkapasitasi, spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom sama ($P < 0,05$) seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

Spermatozoa yang Memiliki Integritas Membran Baik Hasil Seksing

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan spermatozoa yang memiliki integritas membran baik pada lapisan atas $83,49 \pm 5,52\%$ dan lapisan bawah $83,62 \pm 8,63\%$, sama ($P < 0,05$) seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas $83,61 \pm 4,97\%$ dan lapisan bawah $83,76 \pm 5,73\%$ (Tabel 2). Rataan integritas membran spermatozoa hasil *sexing* pada lapisan bawah menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih tinggi daripada lapisan atas (Tabel 2). Adanya perbedaan ini diduga disebabkan oleh spermatozoa yang sampai pada lapisan bawah merupakan spermatozoa yang memiliki motilitas tinggi

(Susilawati, 2002), menandakan bahwa spermatozoa tersebut memiliki integritas membran dan metabolisme yang baik. Jika membran plasma rusak, dapat menyebabkan integritas membran menurun. Akibatnya kontrol sistem transport terganggu yang berakibat pada menurunnya metabolisme, motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa (Herdis *et al.*, 2008). Afiati (2004) melakukan *sexing* dengan albumin putih telur menggunakan pengencer *Brckett-Oliphant* (BO), memperoleh hasil spermatozoa yang memiliki integritas membran baik sesudah *sexing* pada lapisan atas $62,04\%$ dan bawah $63,24\%$. Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% menghasilkan integritas membran hasil *sexing* lebih baik daripada pengencer BO. Kemampuan andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya lesitin yang terdapat pada andromed dan kuning telur yang ditambahkan pada CEP-2. Lesitin berperan melindungi membran spermatozoa selama proses *sexing*, sehingga integritas membran tetap baik. Menurut Sariozkan *et al.*, (2010) komponen yang berpengaruh pada lesitin kedelai adalah *low density lipoprotein* (LDL) yang mirip dengan kuning telur, yang berperan melindungi integritas fosfolipid penyusun membran. Kuning telur yang ditambahkan pada pengencer CEP-2 mengandung LDL, HDL (*high density lipoprotein*), dan lesitin (*phospholipid*) (Belitz *et al.*, 2009) yang berfungsi melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Susilawati, 2002). Adanya makromolekul dalam kuning telur yang berupa lipid dan protein menjadi target oksidasi oleh ROS, sehingga *Reactive Oxygen Species* (ROS) tidak mengoksidasi membran spermatozoa. Oleh karena itu, penggunaan CEP-2 ditambah kuning telur dapat melindungi membran spermatozoa terhadap serangan ROS yang ditunjukkan dengan kadar MDA dan SOD yang tinggi. Penambahan kuning telur pada pengencer CEP-2 dapat melindungi integritas membran dan mempertahankan keutuhan ultrastruktur spermatozoa (Ducha, 2012).

Spermatozoa yang Belum Terkapasitasi Hasil Seksing

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan spermatozoa yang belum terkapasitasi pada lapisan atas $83,58 \pm 1,62\%$ dan lapisan bawah $87,28 \pm 0,09\%$, sama ($P < 0,05$)

seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas 83,61±4,65% dan lapisan bawah 87,38±4,71% (Tabel 2). Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran plasma spermatozoa, sehingga membran tetap stabil dan influks Ca²⁺ yang berlebihan ke dalam spermatozoa dapat diminimalisir. Karena tingginya konsentrasi Ca²⁺ intraseluler merupakan faktor pemicu kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa. Spermatozoa belum kapasitasi menandakan bahwa spermatozoa tersebut memiliki membran yang masih utuh dan normal, artinya tidak mengalami perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid penyusun membran plasma. Spermatozoa belum kapasitasi memiliki membran yang stabil, tidak terjadi hiperpolarisasi membran dan perubahan aliran ion (Felix *et al.*, 2004). Dengan demikian, jumlah spermatozoa yang belum terkapasitasi lebih banyak, sedangkan spermatozoa terkapasitasi dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom dini lebih sedikit. Andromed mengandung lesitin nabati dari ekstrak kedelai yang berperan mempertahankan dan melindungi integritas membran spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% memiliki kondisi pengencer yang sesuai dengan kondisi kauda epididimis sapi. Keadaan tersebut diduga dapat melindungi dan menyediakan lingkungan yang optimal bagi spermatozoa (De Pauw *et al.*, 2003; Verberckmoes *et al.*, 2004). Kuning telur mengandung LDL yang memiliki berat jenis 0,98 dengan 83-89% lipid dan 11-17% protein. Lipid pada LDL mengandung 74% *neutral lipid* (trigliserida dan kolesterol) dan 26% fosfolipid, yang mampu melindungi dan menstabilkan membran spermatozoa (Dauphas *et al.*, 2006). Interaksi (berikatan atau menempel) antara LDL dengan membran

plasma membuat LDL mampu melindungi membran plasma spermatozoa (Pillet *et al.*, 2011). Fosfatidilkolin (lesitin) merupakan salah satu komponen penyusun LDL pada kuning telur yang dapat bergabung dengan membran plasma tanpa memengaruhi membran plasma (Ricker *et al.*, 2006). Selain itu, LDL juga dapat mengikat *bovine seminal plasma* (BSP), yaitu protein yang terkandung dalam seminal plasma dan dapat menyebabkan hilangnya kolesterol dan fosfolipid dari membran spermatozoa. Keadaan tersebut akan menginduksi terjadinya kapasitasi. Oleh karena itu, penambahan kuning telur dalam pengencer menyebabkan interaksi antara LDL dengan BSP sehingga membuat membran spermatozoa stabil (Bergeron dan Manjunath, 2006).

Spermatozoa Terkapasitasi Hasil *sexing*

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan spermatozoa terkapasitasi pada lapisan atas 11,02±0,87% dan lapisan bawah 7,27±2,42% sama (P<0,05) seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas 10,92±3,28% dan lapisan bawah 8,03±2,28% (Tabel 2). Terjadinya kapasitasi pada spermatozoa hasil *sexing* disebabkan karena adanya proses sentrifugasi saat pencucian. Sentrifugasi saat pencucian dilakukan dengan kecepatan 1500 rpm selama lima menit (Susilawati, 2003). Hasil penelitian Safitri (2011) menunjukkan bahwa sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit menyebabkan terjadinya kapasitasi pada spermatozoa kambing sebesar 41,67±5,16%. Proses sentrifugasi menyebabkan hilangnya *decapacitation factors* (DF) dari membran spermatozoa. Faktor dekapasitasi yang terkandung dalam plasma semen, berperan melindungi stabilitas membran spermatozoa dan mengatur aktivitas Ca²⁺-ATPase yang terdapat pada membran kepala spermatozoa. Faktor

Tabel 2. Analisis membran spermatozoa setelah *sexing* menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10%

Parameter	Andromed		CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
	Lap. atas	Lap. Bawah	Lap. atas	Lap. bawah
Integritas membran (%)	83,49 ± 5,52	83,62 ± 8,63	83,61 ± 4,97	83,76 ± 5,73
Belum kapasitasi (%)	83,58 ± 1,62	87,28 ± 0,09	83,61 ± 4,65	87,38 ± 4,71
Kapasitasi (%)	11,02 ± 0,87	7,27 ± 2,42	10,92 ± 3,28	8,03 ± 2,28
Reaksi akrosom (%)	5,40 ± 1,25	5,44 ± 2,39	5,47 ± 1,80	4,59 ± 2,46

Keterangan: CEP-2: *Cauda Epididymal Plasma 2*

dekapasitasi mengaktifkan Ca^{2+} -ATPase untuk mengatur konsentrasi Ca^{2+} intraseluler agar tetap rendah sehingga proses kapasitasi dan reaksi akrosom tidak berlangsung (Fraser, 1998). Rendahnya persentase spermatozoa yang terkapasitasi hasil penelitian ini (Tabel 2) menandakan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa selama proses *sexing*. Hal tersebut ditunjukkan dengan membran yang stabil dan pengaturan regulasi ion Ca^{2+} yang berjalan normal, sehingga proses kapasitasi spermatozoa dapat diminimalisir. Kemampuan pengencer andromed melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya lesitin nabati yang berperan melindungi membran spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001). Mekanisme kerja lesitin dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu lesitin pada pengencer berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) sehingga mampu mempertahankan kestabilan membran. Penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan ROS, sehingga dapat mempertahankan spermatozoa yang belum terkapasitasi, meminimalisir proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Ducha, 2012). Pengencer CEP-2 mengandung *bovine serum albumin* (BSA), yang berperan mencegah masuknya Ca^{2+} yang berlebihan ke sitosol dan melindungi membran spermatozoa, sehingga meminimalisir spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom dini. Menurut Landim-Alvarenga *et al.* (2004) BSA merupakan makromolekul yang berperan mengikat Ca^{2+} , mencegah masuknya Ca^{2+} yang berlebihan ke sitosol, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan kalsium melewati membran dan menghambat akumulasi Ca^{2+} intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa, sehingga viabilitas, motilitas dan spermatozoa yang belum terkapasitasi dapat dipertahankan tetap tinggi.

Spermatozoa yang Sudah Mengalami Reaksi Akrosom Hasil *Sexing*

Sexing menggunakan pengencer andromed menghasilkan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom pada lapisan atas $5,40 \pm 1,25\%$ dan lapisan bawah $5,44 \pm 2,39\%$, sama ($P < 0,05$) seperti pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas $5,47 \pm 1,80\%$ dan lapisan bawah $4,59 \pm 2,46\%$

(Tabel 2). Terjadinya reaksi akrosom spermatozoa karena adanya proses sentrifugasi yang menyebabkan perubahan fungsi membran akibat berkurangnya membran plasma utuh (Afiati, 2004). Safitri (2011) melaporkan bahwa sentrifugasi terhadap spermatozoa kambing dengan kecepatan 1800 rpm selama lima menit menyebabkan terjadinya reaksi akrosom sebesar $28,50 \pm 3,21\%$. Menurunnya fungsi membran sebagai kontrol terhadap sistem transport akibat sentrifugasi menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap ion Ca^{2+} sehingga konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler meningkat. Konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler yang tinggi diperlukan untuk meningkatkan fosforilasi protein tirosin untuk memodulasi gerakan *flagellum* spermatozoa (Asmarinah, 2010; Naz dan Rajesh, 2004) dan penggabungan antara membran plasma dengan membran luar akrosom, sehingga terjadi reaksi akrosom (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004). Persentase spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom setelah *sexing* menggunakan pengencer andromed tidak berbeda dengan CEP-2 ditambah kuning telur 10% (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat meminimalisir reaksi akrosom spermatozoa dengan melindungi membran akrosom spermatozoa. Keadaan ini diduga karena albumin pada BSA yang terkandung dalam pengencer CEP-2 memiliki kemampuan mencegah akumulasi Ca^{2+} intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa. Akumulasi Ca^{2+} intraseluler yang berlebihan perlu dikurangi karena peningkatan Ca^{2+} intraseluler dua kali lipat dibandingkan kondisi normal menyebabkan terjadinya penurunan motilitas, yaitu penurunan kecepatan dan gerak progresif spermatozoa (Landim-Alvarenga *et al.*, 2004). Albumin yang terdapat dalam serum bertindak sebagai antioksidan yang mampu menghambat peroksidasi lipid penyusun membran sel sehingga penurunan motilitas spermatozoa dapat dihindari (Alvarez dan Storey, 1995). Pengencer CEP-2 mengandung BSA yang dapat mengurangi radikal bebas yang dibentuk oleh stres oksidatif dan melindungi integritas membran spermatozoa. Pengencer yang ditambahkan BSA dapat melindungi membran akrosom dan integritas membran (Uysal dan Bucak, 2007). Pengencer andromed mampu melindungi membran akrosom spermatozoa karena adanya kandungan lesitin. Herdis *et al.*, (2008) melaporkan, pengencer andromed mengandung

lesitin nabati sebanyak 6,76 g/100 ml, yang mampu melindungi membran spermatozoa (Hammadeh *et al.*, 2001).

SIMPULAN

Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga membran spermatozoa hasil *sexing* dengan gradien albumin (putih telur). Pengencer tersebut dapat menjaga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa yang belum terkapasitasi tetap tinggi, sedangkan spermatozoa yang terkapasitasi dan spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom dijaga tetap rendah.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan kualitas spermatozoa hasil *sexing* dengan kemampuan fertilisasi, serta penggunaan CEP-2 ditambah kuning telur 10% sebagai pengencer dalam pembekuan spermatozoa hasil seksing.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian yang dibiayai oleh Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi: Aplikasi teknologi Terpadu dan Intervensi Masyarakat dalam Rangka Penguatan Sistem Industri Sapi Potong Berbasis Lokal.

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati F. 2004. Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin. *Jurnal Media Peternakan* 27(1):16-20.
- Aires VA, Hinsch KD, Schloesser FM, Bogner K, Schloesser SM, Hinsch E. 2003. In Vitro and In Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen. *Theriogenology* 60(2):269-279.
- Alvarez JG, Stroyer BT. 1995. Differential Incorporation of Fatty Acid Into and Peroxidative Loss of Fatty Acid From Phospholipid of Human Spermatozoa. *Journal Mol Reprod Dev* 42:334-345.
- Asmarinah. 2010. Peran Molekul Kanal Ion pada Fungsi Spermatozoa. *Majalah Kedokteran Indonesia* 60(8):374-380.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P. 2009. Structure, Physical Properties and Composition Eggs. *Food Chemistry* 546-561.
- Bergeron A, Manjunath P. 2006. New Insights Towards Understanding The Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Journal Mol Reprod Dev* 73:1338-1344.
- Correa JR, Zavos PM. 1994. The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate The Functional Integrity of The Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane. *Theriogenology* 42:351-360.
- Dauphas S, Beaumont V, Riaublanc A, Anton M. 2006. Hen Egg Yolk Low-Density Lipoproteins ùlm Spreading at The Air-Water and Oil-Water Interfaces. *Journal Agric Food Chem* 54:33-37.
- De Pauw I, Van Soom A, Verberckmoes S, de Kruif A. 2003. Suitability of Sperm Function Tests for The Evaluation of Sperm Quality and Bull Fertility. *Theriogenology*. 19-38.
- Delgado PA, Lester TD, Rorie RW. 2009. Effect of a Low-Sodium, Choline-Based Diluent on Viability of Bovine Sperm Stored at Refrigerator Temperatures. *Arkansas Animal Science Department Report* 77-79.
- Ducha N. 2012. Suplementasi Kuning Telur dalam Pengencer CEP-2 terhadap Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Suhu 4-5°C. Disertasi Universitas Brawijaya Malang.
- Felix R, Lo'pez-Gonza'lez I, Mun'oz-Garay C, Darszon A. 2004. Ion Channels and Sperm Function. *Advances in Molecular and Cell Biology* 32:407-431.
- Fraser LR, Ebeydeera LR, Niwa K. 1995. Ca⁺⁺ Regulation Mechanism That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytose as Determined by Chlortetracycline Analysis. *Mol-Reprod Dev* 40:233-241.
- Fraser LR. 1998. Sperm Capacitation and The Acrosome Reaction. *Human Reprod* 13:9-19.
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals 7th Edition*. Lippincott Williams and Wikins. Philadelphia. USA. 96-110.

- Hafez ESE, Hafez B. 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In *Reproduction in Farm Animal*. 6th Edition. Lippincott Williams and Wikins. Philadelphia. 440-443.
- Hammadeh ME, George T, Rosenbaum P, Schmidt W. 2001. Association Between Freezing Agent and Acrosome Damage of Human Spermatozoa From Sub Normal and Normal Sperm. *Journal Andrologia* 32:331-336.
- Herdis M, Surachman, Yulnawati, Rizal M, Maheshwari H. 2008. Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang pada Penambahan Maltosa dalam Pengencer Andromed®. *J Indon Trop Anim Agric* 33(2) : 101-106.
- Jayendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an Assay to Assess The Functional Integrity of The Human Sperm Membrane and its Relationship to Other Semen Characteristics. *Journal Reprod. Fertil* 70:219-228.
- Landim-Alvarenga FC, Graham JK, Alvarenga MA, Squires EL. 2004. Calcium Influx Into Equine and Bovine Spermatozoa During In Vitro Capacitation. *Journal Animal Reproductive* 1(1):96-105.
- Naz RK, Rajesh PB. 2004. Review Role of Tyrosine Phosphorylation in Sperm Capacitation/Acrosome Reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2(75):1-12.
- Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. 2011. Egg Yolk Plasma Can Replace Egg Yolk in Stallion Freezing Extenders. *Theriogenology* 75:105-114.
- Pratiwi WC, Pamungkas D, Affandhy L, Hartati. 2006. Evaluasi Kualitas Spermatozoa Hasil Sexing pada Kemasan Straw Dingin yang Disimpan pada Suhu 5°C Selama 7 Hari. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006* 143-150.
- Rahmah Z. 2007. Perubahan Integritas Membran Spermatozoa pada Proses Sexing dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. Tesis. Malang. Universitas Brawijaya.
- Ricker JV, Linfor JJ, Delûno WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, Meyers SA. 2006. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Journal Biol Reprod* 74:359-365.
- Safitri DH. 2011. Pengaruh Lama Waktu Sentrifugasi Semen Domba Ekor Gemuk terhadap Persentase Kapasitas dan Reaksi Akrosom Spermatozoa. *Artikel Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya. 1-11.
- Saili T, Toelihere MR, Boediono A, Tappa B. 2000. Keefektifan Albumen sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y. *Jurnal Hayati* 7(4):106-109.
- Sariozkan S, Tuncer PB, Bucak MN. 2010. The Effects of Diluend Egg Yolk Concentration Used with Soy Bean Lecithin-Based-Extender on Semen Quality of Freeze Bull Semen. *Eurasian Journal of Veterinary Science* 26(1):45-49.
- Singh KS, Gandhi KK. 2001. Capacitation and Acrosome Reaction in Buffallo Bull Spermatozoa Assessed by Chlortetracycline and Pisum Sativum Agglutinin Fluorescence Assay. *Theriogenology* 55:1457-1468.
- Susilawati T. 2002. Sexing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Gradien Putih Telur. *Widya Agrika* 10(2):97-105.
- Susilawati T. 2003. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur. *Jurnal Ilmiah dan Ilmu Peternakan dan Perikanan* 20:1431-1438.
- Susilawati T, Hermanto, Srianto P, Yuliani E. 2002. Pemisahan Spermatozoa X dan Y pada Sapi Brahman Menggunakan Gradien Putih Telur pada Pengencer Tris dan Trus Kuning Telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Live Sciences)* 14(2):176-181.
- Uysal O, Bucak MN. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on The Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *ACTA VET. BRNO 2007* 76:83-390.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, de Kruif A. 2004. Comparison of Three Diluents for The Storage of Fresh Bovine Semen. *Theriogenology* 42-63.