

Pengaruh Waktu Sentrifugasi pada Sexing Spermatozoa dengan Media Bovine Serum Albumin terhadap Membran Plasma Uteh Spermatozoa X-Y Sapi Simmental

Effect of Centrifugation Time in Sperm Sexing with Bovine Serum Albumin Media on X-Y Whole Plasma Membran of Simmental

Langgeng Priyanto¹, Oktora Dwi Putranti², Riswandi¹, Muhammad Gunawan³, Apriansyah Susanda⁴, Eva Setianingsih¹

¹Departement of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Sriwijaya, Sumatera Selatan 30862. E-mail address: priyantolanggeng@gmail.com

²Fakultas Pertanian, Prodi Peternakan. Universitas Khairun. Ternate. Maluku Utara. Email: oktora.unkhair@gmail.com

³Pusat Riset Bioteknologi, Organisasi Riset Ilmu Pengetahuan Hayati, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Jl. Raya Bogor Km.46 Cibinong Kab. Bogor. Email: muhammadgunawan1976@gmail.com

⁴Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. Jawa Timur. Email: Cheesyana@gmail.com

Received : 10 September 2022

Accepted : 24 November 2022

Available online : 2 Desember 2022

ABSTRACT

This study aims to obtain the right centrifugation time for sexing spermatozoa with Bovine Serum Albumin media against the intact plasma membrane of X-Y spermatozoa in Simmental cattle. This research was carried out from October to November 2021 at the Laboratory of Animal Reproduction and Health at the Forage Breeding Center for Animal Feed, Sembawa. This study used a completely randomized design (CRD) with 3 treatments of centrifugation time (P1: 4 minutes, P2: 8 minutes, and P3: 12 minutes) and 4 replications. The parameters observed were intact plasma membranes of spermatozoa X and Y. The results showed that the centrifugation time treatment had a significant effect on the intact plasma membrane of spermatozoa on X and Y spermatozoa ($P < 0.05$). The result of the right time treatment was centrifugation time of 4 minutes where the value of the upper layer of the intact plasma membrane X semen sexing was 62.93%, the bottom layer Y was 63.94%.

Keywords: *Bovine Serum Albumin, Centrifugation, Plasma membrane*

ABTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan waktu sentrifugasi yang tepat pada *sexing* spermatozoa dengan media Bovine Serum Albumin terhadap membran plasma utuh spermatozoa X-Y pada sapi Simmental. Penelitian ini dilaksanakan Oktober 2021 sampai dengan November 2021 di Laboratorium Reproduksi dan Kesehatan Ternak Balai Pembibitan Hijauan Pakan Ternak Sembawa. Penelitian ini menggunakan rancangan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan (P1: waktu sentrifugasi 4 menit; P2: waktu sentrifugasi 8 menit; dan P3: waktu sentrifugasi 12 menit) dan 4 ulangan. Parameter yang diamati adalah membran plasma utuh spermatozoa X dan Y. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan waktu sentrifugasi berpengaruh nyata terhadap membran plasma utuh spermatozoa pada spermatozoa X dan Y ($P < 0,05$). Hasil penggunaan waktu yang tepat yaitu pada P1 dengan waktu sentrifugasi 4 menit dimana nilai lapisan atas membran plasma utuh X semen *sexing* yaitu sebesar 62,93%, lapisan bawah Y sebesar 63,94%.

Kata Kunci: *Bovine Serum Albumin, Sentrifugasi, Membran plasma*

PENDAHULUAN

Ilmu pengetahuan teknologi di sektor peternakan yang berkembang memiliki fungsi yang strategis dalam upaya meningkatkan mutu kualitas ternak dan populasinya, salah satunya pada aplikasi Inseminasi Buatan (IB). Penggunaan semen IB dapat dilakukan dengan melihat produktivitas dan keunggulan jenis sapi yang akan digunakan, seperti halnya pada penggunaan semen sapi Simmental. Aidilof (2015) menyatakan bahwa sapi Simmental disenangi oleh peternak karena beberapa keunggulan, seperti pertumbuhan badan yang relatif cepat, fertilitas tinggi dan mudah beranak. Penggunaan IB pada sapi Simmental juga dapat ditingkatkan nilainya dalam menghasilkan bibit unggul berdasarkan jenis kelamin anakan sesuai tujuan pemeliharaan dengan teknologi sexing pada spermatozoa. Pemanfaatan teknologi sexing merupakan salah satu upaya untuk mendukung penerapan inseminasi buatan.

Metode pemisahan spermatozoa X dan Y telah banyak dilakukan seperti dalam penggunaan Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai medianya dan sentrifugasi untuk memisahkan spermatozoa dengan plasma sperma. Sexing spermatozoa dengan media BSA pada prinsipnya yaitu merupakan kombinasi konsentrasi antara fraksi atas dan fraksi bawah, karena untuk memisahkan spermatozoa kromosom X dan Y berdasarkan pada motilitasnya. Kombinasi konsentrasi BSA dapat digunakan sebagai media, karena dinilai mampu mempertahankan membran sperma dari kerusakan akibat proses sexing dan memperbaiki tingkat abnormalitas pada spermatozoa. Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan lama waktu yang tepat pada lama waktu sentrifugasi pada sexing spermatozoa dengan media Bovine Serum Albumin (BSA) terhadap morfologi spermatozoa dan membran plasma utuh X-Y pada sapi Simental.

MATERI DAN METODE

Sampel yang digunakan adalah semen sapi Simmental dengan satu kali penampungan setiap satu minggu sekali pada hari Rabu waktu pagi hari.

Penelitian ini akan dilaksanakan di Balai Pembibitan Hijauan Pakan Ternak (BPHPT) Sembawa Banyuasin Sumatera Selatan dan Laboratorium Reproduksi dan Kesehatan Ternak BPHPT Sembawa. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktobersampai November 2021.

Alat yang digunakan yaitu kandang jepit, teaser, vagina buatan (silinder karet tipis, silinder karet tebal dan corong karet), tabung penambung semen, water bath, tabung ukur, gelas ukur, erlenmeyer,

drying dan sterilization oven, spectrophotometer, tabung reaksi, tabung sentrifugasi, centrifuge, mikroskop Trinokuler, timbangan elektrik, mikropipet, pinset, rak tabung, mikro pipet, mikroskop, object glass, cover glass, kertas tabel, alat tulis (pulpen, label) dan tisu, straw, automatic straw filling, printing straw. Bahan yang digunakan yaitu semen sapi Simmental, Bovine Serum Albumin (BSA), medium sexing, NaCl 0,9 %, Tris (Hydroymethyl) aminomethan, asam sitrat, fruktosa, aquabides, kuning telur, gliserol, penicillin, streptomycin, vaselin, semen segar, aquabidetilata, eosin-negrosin, air panas.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 Perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan ini adalah perbedaan waktu sentrifugasi sexing yang terdiri atas :

P1: Waktu sentrifugasi 4 menit

P2: Waktu sentrifugasi 8 menit

P3: Waktu sentrifugasi 12 menit

Analisis Penentuan Membran Plasma Utuh (MPU)

Keutuhan membran plasma dievaluasi menggunakan larutan Hypoosmotic Swelling Test (HOS). Sebanyak 10 µl semen dimasukkan ke dalam mikrotub berisi 1000 µl larutan Hypoosmotic Swelling Test (HOS) (1.351 g fruktosa dan 0.735 g Na-sitrat dalam 100 mL aquadest, osmoralitas 150 mOsm), dihomogenkan. Campuran larutan tersebut di simpan dalam water bath dengan suhu 37°C.

Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh akan menunjukkan ekornya melingkar atau menggelembung, sedangkan jika rusak akan menunjukkan ekor yang lurus apabila dipaparkan di dalam larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop dengan cahaya perbesaran 10x40 (Rizal, 2006). Perhitungan persentase spermatozoa yang bereaksi terhadap larutan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS) dilakukan dengan cara

$$\text{MPU \%} = \frac{\text{Total spermatozoa yang bereaksi}}{\text{total spermatozoa yang bereaksi} + \text{tidak bereaksi}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis sidik ragam. Jika ada perbedaan yang nyata antar rata-rata perlakuan ($P < 0,05$), maka akan dilakukan uji Duncan's Multiple Range Test (D MRT) (Steel and Torrie, 2002).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Membran Plasma Utuh (MPU) X-Y Semen Sexing Dengan Sentrifugasi

Hasil nilai rata-rata hasil pengukuran waktu sentrifugasi 4,8,12 menit pada sexing spermatozoa

dengan media *Bovine Serum Albumin* (BSA) pada Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa lapisan atas dan bawah X-Y sapi Simmental menunjukkan adanya penurunan yang dapat terlihat pada Table 1.

Tabel 1. Nilai rata-rata Membran Plasma Utuh (MPU) lapisan atas dan bawah spermatozoa X-Y sapi Simmental dengan sentrifugasi

Perlakuan	Membran plasma utuh lapisan atas	Membran Plasma Utuh Lapisan Bawah
P1	62,93 ^a ± 3,89	63,94 ^a ± 6,78
P2	61,75 ^b ± 2,77	60,35 ^b ± 2,96
P3	54,49 ^c ± 3,05	54,04 ^c ± 1,57

Keterangan: Rata-rata dengan superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), P1= waktu sentrifugasi 4 menit, P2= waktu sentrifugasi 8 menit, P3= waktu sentrifugasi 12 menit

Menurunnya MPU tersebut dikarenakan spermatozoa mengalami serangkaian perlakuan seperti penggunaan media BSA dan waktu sentrifugasi yang digunakan saat proses pemisahan semen sexing. Proses pemisahan semen sapi Simmental dilakukan dengan menggunakan konsentrasi BSA 5% dan BSA 10%. Solihati *et al.* (2020) melaporkan bahwa penggunaan BSA 5% memiliki nilai pH 7,43, densitas 1,0547 g/ml, dan viskositas sebesar 0,8648 cP, sedangkan untuk BSA 10% memiliki nilai pH 7,40, densitas 1,0661 g/ml, viskositas 1,0378 cP. Karakteristik dari BSA merupakan salah satu alasan yang digunakan untuk pemisahan semen sexing, nilai pH BSA yang netral ini membuat spermatozoa dalam kondisi nyaman melalui dengan kolom albumin, hal ini dikarenakan sperma tidak melewati perubahan pH internal. Penurunan yang terjadi disebabkan juga karena adanya gesekan oleh sentrifugasi yang terjadi pada spermatozoa dengan tabung maupun media BSA yang digunakan. Semakin besar gesekan mekanik dan lama waktunya maka semakin akan semakin besar juga kerusakan membran plasma dan dapat terjadi penurunan pada MPU spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mahfud *et al.* (2019) pada tahap proses sentrifugasi menyebabkan pergesekan antara spermatozoa dengan medium dan antara permatozoa lainnya yang akan menyebabkan kerusakan struktur membran sel spermatozoa.

Dibandingkan dengan penurunan dari lapisan atas jika dilihat pada (Tabel 1) pada MPU lapisan bawah mengalami penurunan yang sedikit lebih besar. Salah satu penyebab perbedaan tersebut karena spermatozoa X memiliki ukuran yang lebih besar dengan pergerakan lambat hanya dapat berpindah sampai ke medium lapisan atas, sedangkan

spermatozoa Y memiliki ukuran kepala yang lebih kecil dengan kecepatan yang lebih tinggi daripada spermatozoa X sehingga lebih mampu bergerak melalui dan menembus medium pemisah hingga ke lapisan paling bawah yang konsentrasinya lebih tinggi dan dapat meningkatkan proses metabolisme dari spermatozoa.

Afiati (2004) menyatakan bahwa spermatozoa Y akan bergerak ke bawah sedangkan spermatozoa X tetap berada pada lapisan atas, karena spermatozoa pembawa kromosom Y memiliki motilitas lebih tinggi dibanding spermatozoa pembawa kromosom X. Radikal bebas yang bereaksi dengan oksigen akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) lalu kondisi ini merusak membran plasma. Faktor inilah yang diduga menyebabkan penurunan nilai persentase membran plasma utuh (MPU) akibat adanya zat toksin yang bersumber dari spermatozoa yang mati maupun dari proses sentrifugasi sehingga diduga dapat terjadi peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dari sisa hasil metabolisme spermatozoa karena proses sentrifugasi yang belum berjalan baik.

Hal ini sejalan dengan pendapat Agarwa *et al.* (2014) bahwa peningkatan produksi ROS oleh spermatozoa setelah dilakukan sentrifugasi diduga merupakan proses kompleks dan dapat berasal dari berbagai proses kimiawi yang terjadi pada organel sel atau yang berasal dari sel. Pengaruh dari menurunnya persentase MPU spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi pada waktu yang berbeda dengan kecepatan 1500 rpm ini diduga oleh terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Choudhary *et al.* (2010) bahwa pada kalium dan ion natrium yang ada pada

kandungan plasma seminalis ini berperan penting untuk menjaga integritas membran plasma, sedangkan pada protein berfungsi untuk melindungi membran plasma agar fleksibel.

KESIMPULAN

Perlakuan waktu sentrifugasi berpengaruh nyata terhadap membran plasma utuh spermatozoa baik pada spermatozoa X dan Y ($P < 0,05$). Dari hasil penggunaan waktu sentrifugasi, penggunaan waktu sentrifugasi yang tepat yaitu pada perlakuan P1 dengan waktu sentrifugasi 4 menit dimana nilai lapisan atas membran plasma utuh X semen *sexing* yaitu sebesar 62,93%, lapisan bawah Y sebesar 63,94%.

DAFTAR PUSTAKA

Afiati, L. (2004). Proporsi dan karakteristik spermatozoa X dan Y hasil separasi kolom albumin. *Media Peternakan* 27 (1):16-20.

Aidilof. (2015). Penampilan reproduksi sapi Aceh dengan sapi Brahman dan dengan sapi Simental melalui inseminasi buatan di

Kecamatan Padang Tiji. *Sains Riset*, 5(1) : 1-10.

Choudhary, R., Chawala, V.K., Soni, N.D., Kumar, J., Vyas, R.K., (2010). Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility. *Pak J Physiol.* 6:54-59.

Mahfud, A., N. Isnaini, A.P.A. Yeksi, Kuswati, dan T. Susilawati. (2019). Kualitas spermatozoa post thawing semen beku sperma y hasil *sexing* pada sapi limousin. *Jurnal Ternak Tropika.*20(1) : 1-7.

Solihati, N., Rasad, S.D., Hilmia, N., Winangun, K., Toha, Zule, O.V., (2020). Characteristic Several Level of Bovine Serum Albumin (BSA) and Its Combination as Albumin Column for Sperm Sexing. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner Virtual.* Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H., (2002). *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach.* Second Edition McGraw-Hill Book Company London.