

MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA SAPI LIMOUSIN SELAMA PENYIMPANAN PADA REFRIGERATOR DALAM PENGECER CEP-2 DENGAN SUPLEMENTASI KUNING TELUR

Motility and Viability of Limousin Bull Sperm in CEP-2 Extender with Egg Yolk Supplementation during Storage in Refrigerator

Nur Ducha¹, Trinil Susilawati², Aulanni'am³, dan Sri Wahyuningsih²

¹Laboratorium Reproduksi Hewan Jurusan Biologi Universitas Negeri Surabaya, Surabaya

²Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

³Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: nurducha@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan kuning telur dalam pengencer CEP-2 terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin. Penelitian menggunakan rancangan acak kelompok dengan 10 kali ulangan dari 10 ejakulat dari sapi yang berbeda. Spermatozoa disimpan selama delapan hari. Motilitas spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya (200x) pada suhu 37° C. Viabilitas spermatozoa diamati dengan pewarnaan eosin-negrosin menggunakan mikroskop cahaya (400x). Hasil penelitian menunjukkan suplementasi kuning telur pada pengencer CEP-2 berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin selama penyimpanan pada suhu 4-5° C. Konsentrasi kuning telur terbaik adalah 20% dalam mempertahankan motilitas (44,25±3,92%) dan viabilitas (87,46±5,40%) spermatozoa sapi *Limousin* setelah penyimpanan delapan hari pada suhu 4-5° C.

Kata kunci: CEP-2, kuning telur, motilitas, viabilitas, spermatozoa sapi Limousin

ABSTRACT

The aim of this research was to study the effect of egg yolk supplementation in CEP-2 extender on motility and viability of Limousin bull sperm. The research used Randomized Block Design with ten repetitions from ten different bulls. Sperm was stored for eight days. Sperm motility was observed using light microscopy (200x) at temperature of 37° C. Sperm viability was observed with eosin negrosin staining by light microscopy (400x). The result of the research showed that egg yolk supplementation in CEP-2 extender effect the motility and viability of Limousin bull sperm during storage at 4-5° C. The best egg yolk concentration was 20% in protecting the motility (44.25±3.92%) and viability (87.46±5.40%) of Limousin bull sperm after storage at 4-5° C.

Key words: CEP-2, egg yolk, motility, viability, Limousin bull sperm

PENDAHULUAN

Semen yang disimpan baik pada suhu refrigerator maupun suhu beku membutuhkan pengencer yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Pengencer *cauda epididymal plasma* (CEP-2) adalah salah satu jenis pengencer untuk penyimpanan spermatozoa sapi pada suhu refrigerator. Pengencer CEP-2 mengandung sumber energi berupa fruktosa, beberapa mineral (seperti Na, Ca, K), pH, dan osmolaritas yang sama dengan keadaan pada plasma kauda epididimis (Verbeckmoes *et al.*, 2004; Verbeckmoes *et al.*, 2005).

Proses penyimpanan pada suhu rendah dapat merugikan spermatozoa baik struktural maupun fungsional akibat terjadinya *cold shock* (Hafez, 2008; Munoz *et al.*, 2010) maupun dari keberadaan *reactive oxygen species* (ROS). *Cold shock* menyebabkan terjadinya perubahan susunan lipid membran akibat perubahan fase lipid dan fluiditas membran pada sapi dan kambing (Leeuw *et al.*, 1990; Zeron *et al.*, 2007; Gaczaezewicz *et al.*, 2010), maupun pada domba (Galcheva dan Srivastava, 1993), yang menyebabkan lepasnya beberapa komponen fosfolipid dan kolesterol

(Watson dan Morris, 1987) dan hilangnya beberapa proteinase akrosin (Church dan Graves, 1976), sehingga dapat menyebabkan hilangnya integritas. Keberadaan ROS selama penyimpanan juga dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa, karena ROS menyebabkan oksidasi baik lipid maupun protein membran sehingga menyebabkan integritas membran akan terganggu (Sanocka dan Kurpisz, 2004). Perubahan integritas membran dapat menyebabkan perubahan fisiologi diantaranya peningkatan pemasukan natrium dan kalsium ke dalam sel, pemasukan oksigen menurun sehingga aktivitas metabolik dan motilitas akan menurun (Watson dan Morris, 1987; White, 1993).

Dalam pengencer perlu penambahan bahan lain yang dapat berfungsi sebagai pelindung ekstraseluler selama penyimpanan (Hafez, 2008). Kuning telur sering ditambahkan dalam pengencer karena terbukti dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa sapi (Moce dan Graham, 2006), menyediakan infrastruktur membran, dan menambah fluiditas membran yang dapat meningkatkan kemampuan fertilisasi (Ladha, 1998), mengubah fase transisi lipid selama terjadi perubahan suhu sehingga dapat mengurangi sensitivitas terhadap suhu dingin (Zeron *et al.*, 2002). Penelitian ini

bertujuan mengetahui pengaruh kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin.

MATERI DAN METODE

Preparasi Pengencer

Bahan kimia pengencer CEP-2 terdiri atas NaCl 15 mmol/l; KCl 7,0 mmol/l; $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 3,0 mmol/l; $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ 3,0 mmol/l; NaHCO_3 11,9 mmol/l; NaH_2PO_4 8,0 mmol/l; KH_2PO_4 20,0 mmol/l; fruktosa 55 mmol/l; sorbitol 1,0 g/l; BSA 2,0 g/l; Tris 133,7 mmol/l; penisilin 1000 IU; streptomisin 1 g; asam sitrat mmol/l. Bahan-bahan tersebut diperoleh dari Sigma dan dibuat *aliquot* dengan menggunakan *deionized water* steril. Osmolaritas pengencer berkisar 250-350 mosm, sedangkan pH berkisar antara 6-7. Sterilisasi media menggunakan membran milipor dengan ukuran pori 0,22 μm . Pengencer CEP-2 ditambahkan kuning telur segar berasal yang biasa digunakan di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Konsentrasi kuning telur bervariasi yaitu 10; 15; dan 20%.

Koleksi dan Preparasi Semen

Semen segar dikoleksi dari sapi yang terseleksi untuk inseminasi buatan dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang dengan menggunakan vagina buatan, dan selanjutnya diuji kualitasnya meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Semen segar yang digunakan adalah semen yang memiliki persyaratan Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk IB yaitu motilitas individu $\geq 70\%$, motilitas massa minimal 2+, dan abnormalitas dan viabilitas $\geq 70\%$.

Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Semen diambil dengan ose dan diletakkan pada gelas objek dan ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya ditempatkan di atas *slide warmer* suhu 37°C dan diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400x (Padilla dan Foote, 1991; Bayemi *et al.* 2010; Boonkusal *et al.*, 2010). Penilaian dilakukan dengan mengamati gerakan progresif dan dibandingkan dengan spermatozoa yang memiliki gerakan mundur atau hanya berputar mengikuti metode Garner dan Hafez (2008).

Pengamatan Viabilitas Spermatozoa

Semen (segar dan perlakuan) diteteskan pada gelas objek menggunakan ose. Eosin-negrosin diteteskan menggunakan ose lain, kemudian keduanya dicampur. Campuran semen dengan eosin-negrosin dibuat olesan dengan ujung gelas objek yang lain hingga didapatkan olesan sepanjang permukaan gelas objek. Preparat ulas dikeringkan kemudian diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang masih hidup tidak berwarna sedangkan yang sudah mati berwarna merah (Bansal dan Bilaspuri, 2008).

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan sepuluh kali ulangan. Data hasil pengamatan berupa persentase ditransformasi ke *arcsine* (Yitnosumarto, 1993), selanjutnya dianalisis dengan uji normalitas. Hasil uji normalitas menunjukkan distribusi normal, maka dianalisis dengan menggunakan analisis varian. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dianalisis dengan uji jarak berganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas Spermatozoa Selama Penyimpanan

Rataan dan simpang baku persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin dalam pengencer CEP-2 dengan suplementasi kuning telur disajikan pada Tabel 1.

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin mulai dari terbesar sampai terkecil pada hari ke-8 penyimpanan masing-masing adalah CEP-2-KT20% (44,25% \pm 3,92), CEP-2-KT15% (42,25% \pm 4,25), CEP-2-KT10% (38,50% \pm 6,99), dan CEP-2 (0,35% \pm 0,58). Kelompok CEP-2 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan CEP-2-KT10%, CEP-2-KT15%, dan CEP-2-KT20%. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa dalam pengencer CEP-2 tanpa kuning telur lebih rendah dibandingkan dengan yang mengandung kuning telur.

Hasil analisis menunjukkan terdapat pengaruh lama penyimpanan terhadap motilitas spermatozoa. Persentase motilitas spermatozoa pada hari ke-0 sampai ke-4 menunjukkan perbedaan yang nyata antara

Tabel 1. Persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin setiap hari dalam pengencer CEP-2 dengan kuning telur dan tanpa kuning telur selama penyimpanan pada suhu $4-5^\circ\text{C}$

Pengencer	Rataan motilitas selama hari penyimpanan (%) \pm SD									
	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	
CEP-2	63,75 \pm 2,43 ^a	40,00 \pm 7,45 ^a	25,35 \pm 12,76 ^a	14,40 \pm 14,09 ^a	8,15 \pm 8,25 ^a	4,20 \pm 6,233 ^a	2,10 \pm 2,92 ^a	0,70 \pm 0,82 ^a	0,35 \pm 0,58 ^a	
CEP-2-KT10%	67,00 \pm 1,05 ^b	60,00 \pm 3,53 ^b	59,00 \pm 3,76 ^b	57,00 \pm 3,50 ^b	53,50 \pm 4,44 ^b	50,50 \pm 4,38 ^b	50,00 \pm 4,08 ^b	45,75 \pm 5,14 ^b	38,50 \pm 6,99 ^b	
CEP-2-KT15%	67,50 \pm 0,00 ^b	61,50 \pm 3,38 ^b	60,00 \pm 3,73 ^b	57,75 \pm 2,99 ^b	55,25 \pm 3,81 ^b	53,50 \pm 4,74 ^{bc}	52,00 \pm 5,38 ^{bc}	48,50 \pm 4,60 ^c	42,25 \pm 3,99 ^c	
CEP-2-KT20%	67,50 \pm 0,00 ^b	61,00 \pm 3,16 ^b	60,00 \pm 3,73 ^b	59,00 \pm 4,60 ^b	56,50 \pm 5,30 ^b	55,00 \pm 4,08 ^c	54,00 \pm 3,94 ^c	49,50 \pm 3,87 ^c	44,25 \pm 3,92 ^c	

^{a, b, c} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa (H = hari ke-; KT = kuning telur)

Tabel 2. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa sapi Limousin setiap hari dalam pengencer CEP2 dengan kuning telur dan tanpa kuning telur selama penyimpanan pada suhu 4-5° C

Pengencer	Rataan motilitas selama hari penyimpanan (%)								
	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
CEP-2	88,89± 4,82 ^a	69,42± 13,61 ^a	63,72± 17,37 ^a	53,65± 24,11 ^a	44,95± 16,29 ^a	37,48± 20,90 ^a	28,37± 13,94 ^a	20,99± 13,85 ^a	19,79± 11,62 ^a
CEP-2-KT10%	94,64± 1,85 ^b	90,74± 4,56 ^b	90,51± 5,40 ^b	90,29± 4,08 ^b	89,50± 4,74 ^b	89,11± 3,78 ^b	88,77± 6,14 ^b	88,44± 3,57 ^b	85,53± 6,83 ^b
CEP-2-KT15%	94,93± 2,01 ^b	91,56± 3,69 ^b	91,50± 4,25 ^b	90,23± 4,22 ^b	90,15± 4,53 ^b	88,81± 4,29 ^b	87,50± 4,21 ^b	86,56± 4,14 ^b	85,65± 6,06 ^b
CEP-2-KT20%	95,43± 1,49 ^b	92,17± 1,56 ^b	91,91± 3,59 ^b	91,66± 3,20 ^b	90,89± 3,49 ^b	90,64± 2,50 ^b	90,24± 3,34 ^b	89,85± 3,70 ^b	87,46± 5,40 ^b

^{a, b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa (H = hari ke-; KT = kuning telur)

pengencer CEP-2 tanpa kuning telur dengan pengencer CEP-2 yang mengandung telur. Pengencer CEP2 yang dikembangkan oleh Verbackmoes *et al.* (2004) dan Verbackmoes *et al.* (2005) sama dengan komposisi ion, pH maupun osmolaritas pada epididimis sehingga spermatozoa dapat disimpan seperti penyimpanan yang terjadi epididimis. Namun demikian, dalam suatu pengencer yang digunakan untuk menyimpan spermatozoa tetap dibutuhkan makromolekul seperti kuning telur yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa selama penyimpanan. Keberadaan kuning telur dalam pengencer dapat mempertahankan motilitas spermatozoa selama penyimpanan. Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Bergeron *et al.* (2004) bahwa keberadaan kuning telur atau fraksi lipid kuning telur yaitu *low density lipoprotein* (LDL) dapat melindungi motilitas spermatozoa sapi selama penyimpanan. Zhao *et al.* (2009) membuktikan bahwa penambahan kuning telur dalam pengencer dapat mempertahankan motilitas spermatozoa kambing 40% sampai hari ke-13 penyimpanan.

Persentase motilitas spermatozoa pada CEP2-KT15% tidak berbeda dengan CEP2-KT20%, namun demikian nilai motilitas spermatozoa lebih tinggi pada CEP2-KT20% (44,25%). Hal ini menunjukkan bahwa pengencer CEP2 dengan kuning telur 20% mampu mempertahankan persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin yang terbaik selama penyimpanan pada suhu 4-5° C. Hasil penelitian ini sama dengan penelitian Graham dan Foote (1987) yang menyebutkan bahwa motilitas terbaik spermatozoa sapi selama penyimpanan diperoleh dari spermatozoa yang disimpan dalam pengencer yang mengandung kuning telur 20% atau pengencer yang mengandung fraksi lipid kuning telur 0,5 mM. Perbedaan nilai motilitas meskipun kecil, secara fisiologis dan standar kualitas spermatozoa tetap bermakna walaupun secara statistik perbedaannya tidak bermakna.

Viabilitas Spermatozoa Selama Penyimpanan

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dapat mengalami perubahan selama penyimpanan. Rataan dan simpang baku viabilitas spermatozoa sapi Limousin dalam pengencer CEP-2 disajikan pada Tabel 2.

Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa sapi Limousin mulai dari terbesar sampai terkecil pada hari ke-8 penyimpanan masing-masing adalah CEP2-KT 20% (87,46±5,40%), CEP2-KT 15% (85,65±6,06%), CEP2-KT 10% (85,53±6,83%), dan CEP2 (21,96±11,62%). Hasil analisis ragam dan perbandingan berganda Duncan menunjukkan terdapat dua kelompok yang berbeda nyata, yaitu kelompok pada pengencer CEP2 yang tidak mengandung kuning telur dan kelompok kedua yang mengandung kuning telur mulai hari ke-0 sampai hari ke-8 penyimpanan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kuning telur pada pengencer CEP2 mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa sapi Limousin selama penyimpanan pada suhu 4-5° C.

Persentase viabilitas spermatozoa pada pengencer CEP2 tanpa kuning telur mengalami penurunan yang sangat drastis selama penyimpanan hari ke-8. Penurunan tersebut dapat disebabkan terjadinya kerusakan membran plasma dan membran akrosom akibat pengaruh *cold shock* selama penyimpanan pada suhu rendah (Pereira *et al.*, 2010).

KESIMPULAN

Penambahan kuning telur pada pengencer CEP-2 berpengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa Limousin selama penyimpanan pada suhu 4-5° C. Konsentrasi kuning telur terbaik adalah 20% dalam mempertahankan motilitas (44,25±3,92%) dan viabilitas (87,46±5,40%) spermatozoa sapi Limousin setelah penyimpanan pada hari ke-8 pada suhu 4-5° C.

DAFTAR PUSTAKA

- Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri. 2008. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability, and lipid peroxidation in vitro. **Anim. Reprod.** 5(3):90-96.
- Bayemi, P.H., I. Leinyuy, V.M. Nsongka, E.C. Webb, and A.L. Ebangi. 2010. Viability of cattle sperm under different storage conditions in Cameroon. **Trop. Anim. Health Prod.** 42(8):1779-1783.
- Bergeron, A., M.H. Crete, Y. Brindle, and P. Manjunath. 2004. Low density lipoprotein from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol. Reprod.** 70(3):708-717.

- Church, K.E. and C.N. Graves. 1976. Loss of acrosin spermatozoa following cold shock: Protective effect of seminal plasma. **Cryobiology** 13(3):341-346.
- Galcheva, V.H. and P.N. Srivastava. 1993. Phospholipids of rabbit and bull sperm membranes: Structural order parameter and steady-state fluorescence anisotropy of membranes and membrane Leaflet. **Mol. Reprod. Dev.** 35(2):209-217.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Plasma Semen. In **Reproduction in Farm Animal**. Hafez E.S.E. and B. Hafez (eds.). 7th ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA.
- Graham, J.K. and R.H. Foote. 1987. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology** 24(1):42-52.
- Hafez, E.S.E. 2008. Preservation and Cryopreservation of Gamete and Embryos. In **Reproduction in Farm Animals**. Hafez E.S.E. and B. Hafez (eds.). 7th ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA.
- Ladha, S. 1998. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in high polarized cell, the mammalian spermatozoon. **J. Membrane Biol.** 165(1):1-10.
- Leeuw, F.E., H.C. Chen, B. Colenbrander, and A.J. Verkleij. 1990. Cold induced ultrastructure changes in bull and boar sperm plasma membrane. **Cryobiology** 27(2):171-183.
- Moce, E. and J.K. Graham. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculate improve sperm cryosurvival. **J. Anim. Sci.** 84(4):826-833.
- Munoz, O.V., L.A. Briand, D. Bancharif, M. Anton, S. Deserches, E. Shmitt, C. Thorin, and D. Tainturier. 2010. Effect of low density, spermatozoon concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4° C. **Asian J. Androl.** 13(2):281-286.
- Padilla, A.W. and R.H. Foote. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion. **J. Anim. Sci.** 69(8):3308-3313.
- Pereira, G.R., E.G. Becker, L.C. Siqueira, R. Ferreira, C.K. Severo, V.S. Truzzi, J.F.C. Oliveira, and P.B.D. Goncalves. 2010. Assessment of bovine spermatozoa viability using different cooling protocols prior to cryopreservation. **Italian J. Anim. Sci.** 9(4):234-237.
- Sanocka, D. and M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod. Biol. Endoc.** 2(12):112-117.
- Verbeckmoes, S., A. Van Soom, J. Dewulf, I. De Pauw, and A. de Kruif. 2004. Storage of fresh bovine semen in diluent based on the ionic composition of cauda epididymal plasma. **Reprod. Domest. Anim.** 39(6):1-7.
- Verbeckmoes, S., A. Van Soom, J. Dewulf, and A. de Kruit. 2005. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology** 63(3):912-922.
- Watson, P.F. and G.J. Morris. 1987. Cold shock injury in animal cells. **Symp. Soc. Exp. Biol.** 41:311-340.
- White, G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A Review. **Reprod. Fertil. Dev.** 5(6):639-58.
- Yitnosumarto, S. 1993. **Percobaan Perancangan, Analisis, dan Interpretasinya**. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Zeron, Y., M. Tomczak, J. Crowe, and V. Arav. 2002. The effect of liposome on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: Implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology** 45(2):143-152.
- Zhao, B.T., D. Han, C.L. Xu, M.J. Luo, Z.L. Chang, and J.H. Tan. 2009. Protocol optimization for long term liquid storage of goat semen in a chemically defined extender. **Reprod. Domest. Anim.** 44(6):865-872.