

PENGARUH KECEPATAN SENTRIFUGASI TERHADAP KUALITAS SEMEN KAMBING PERANAKAN ETTAWAH (PE) POST THAWING

The Effect of Centrifugation on Semen Quality of Peranakan Ettawah Goat's Post Thawing

Indiah dan Sri Wahjuningsih

Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: yuningyuning208@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kecepatan sentrifugasi yang optimal pada persiapan spermatozoa kambing peranakan Ettawah (PE) untuk fertilisasi *in vitro* sehingga didapatkan spermatozoa dengan kualitas yang baik. Materi yang digunakan adalah semen beku kambing PE dengan persyaratan motilitas individu > 40%. Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan (eksperimental laboratorium) dengan 4 perlakuan yaitu kecepatan sentrifugasi 1000 (P1), 1500 (P2), dan 2000 rpm (P3), dengan 5 kali ulangan. Sentrifugasi dilakukan selama 5 menit. Variabel pengamatan adalah motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan dilanjutkan dengan uji Tukey. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada lapisan atas untuk P1 diperoleh motilitas; viabilitas; dan abnormalitas spermatozoa masing-masing sebesar 55,72±3,55; 62,99±5,87; dan 7,19±3,64%. Pada P2 diperoleh motilitas; viabilitas; dan abnormalitas spermatozoa masing-masing sebesar 69,55±3,35; 73,99±4,36; dan 8,84±2,65%. Pada P3 diperoleh motilitas; viabilitas; dan abnormalitas spermatozoa masing-masing sebesar 55,19±2,72; 7,39±9,22; dan 6,40±3,00%. Pada lapisan bawah untuk P1 diperoleh motilitas; viabilitas; dan abnormalitas spermatozoa masing-masing sebesar 55,59±3,99; 70,05±7,47; dan 10,36±6,20%. Pada P2 diperoleh motilitas; viabilitas; dan abnormalitas spermatozoa masing-masing sebesar 68,63±3,88; 77,44±1,08; 9,55±3,27%. Pada P3 diperoleh motilitas; viabilitas; dan abnormalitas spermatozoa masing-masing sebesar 57,61±2,20; 69,93±11,98; 8,09±2,80%. Disimpulkan bahwa kecepatan sentrifugasi sebesar 1500 rpm dapat memberikan persentase motilitas dan viabilitas tertinggi baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah.

ABSTRACT

The aim of the research was to determine the optimum of centrifugation on the quality of Peranakan Ettawah goat's spermatozoa prepared for in vitro fertilization preparation. The research of material was frozen semen of Peranakan Ettawah goat produced by Artificial Insemination Center in Singosari with minimum post thawing motility in 40%. The method of the research was an experiment method with the four treatment, i.e: 1000 (P1), 1500 (P2), 2000 rpm (P3) of different centrifugation. The variable observes were spermatozoa motility, spermatozoa viability, and abnormal morphology of spermatozoa. Data obtain was analyzed statistically using Completely Randomize Design and continued with Tukey test. The result showed that on the upper layer of each treatment (P1, P2, and P3) obtained 55,72±3,55; 69,55±3,35; and 55,19±2,72% for spermatozoa motility, 62,99±5,87; 73,99±4,36; and 57,39±9,22% for spermatozoa viability, and 7,19±3,64; 8,84±2,65; and 6,40±3,00% for abnormal morphology of spermatozoa, descriptively. While on the lower layer the result showed 55,59±3,99; 68,63±3,88; and 57,61±2,20% for spermatozoa motility, 70,05±7,47; 77,44±1,08; and 69,93±11,98% for spermatozoa viability, and 10,36±6,20; 9,55±3,27; and 8,09±2,80% for abnormal morphology of spermatozoa, descriptively. It was concluded that centrifugation in 1500 rpm showed the highest motility and viability on the upper layer and lower layer.

PENDAHULUAN

Berbagai upaya telah dilakukan untuk meningkatkan populasi dan produktivitas ternak, diantaranya melalui penerapan program bioteknologi reproduksi transfer embrio (TE). Salah satu alternatif pengadaan embrio untuk TE adalah melalui *In Vitro Fertilization* (IVF).

Keberhasilan IVF untuk memproduksi embrio merupakan faktor penting bagi keberhasilan program transfer embrio karena akan diperoleh embrio dalam jumlah banyak dan harga yang relatif murah.

Rangkaian proses IVF diawali dengan proses koleksi dan maturasi oosit, koleksi dan kapasitas spermatozoa, fertilisasi *in vitro*, dan

perkembangan embrio (Hafez, 2000). Beberapa faktor yang mempengaruhi keberhasilan IVF adalah kemampuan spermatozoa dalam memfertilisasi dan kualitas oosit yang digunakan. Sentrifugasi atau pencucian spermatozoa merupakan suatu cara menyingkirkan komponen-komponen plasma sperma (seminal plasma) yang mengandung kolesterol, glikosaminoglikan, faktor dekapitasi, akrosin tripsin inhibitor, dan unsur plasma sperma lainnya yang dapat mempengaruhi kualitas dan daya fertilisasi spermatozoa

Proses sentrifugasi diduga menyebabkan perubahan-perubahan pada kualitas spermatozoa. Perbedaan kecepatan sentrifugasi pada pencucian spermatozoa untuk persiapan IVF akan berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa tersebut. Oleh karena itu perlu diketahui kecepatan sentrifugasi yang optimal sehingga didapatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa yang tinggi dengan abnormalitas spermatozoa yang rendah.

MATERI DAN METODE

Materi Penelitian

Materi penelitian yang digunakan adalah 20 *straw* semen beku kambing PE berasal dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari (persyaratan PTM > 40 % dan 2+).

Prosedur Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan empat perlakuan kecepatan sentrifugasi, yaitu (kontrol/ P0), 1000 (P1), 1500 (P2), dan 2000 rpm (P3) dengan lama sentrifugasi masing-masing 5 menit. Setiap perlakuan diulang 5 kali.

Variabel Penelitian

a. Motilitas spermatozoa

Penentuan motilitas spermatozoa dilakukan dengan melihat motilitas individu spermatozoa, yang diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Penilaian dilakukan menghitung spermatozoa yang bergerak aktif maju ke depan (gerakan progresif).

b. Viabilitas spermatozoa

Uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin-negrosin.

warna, sedangkan yang mati menyerap warna. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x.

c. Abnormalitas spermatozoa

Morfologi spermatozoa diamati dibawah mikroskop dengan pewarnaan eosin-negrosin. Penilaian dilakukan dengan mengamati 100 spermatozoa, diperiksa jenis abnormalitasnya.

d. Konsentrasi spermatozoa

Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan *haemocytometer*.

Analisis Data

Data hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan, yaitu kecepatan sentrifugasi 1000 (P1), 1500 (P2), dan 2000 rpm (P3) serta 5 kali ulangan untuk membandingkan masing-masing perlakuan. Dari data analisis yang diperoleh jika terdapat perbedaan yang nyata atau sangat nyata, maka dilakukan pengujian selanjutnya menggunakan Uji Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Semen Kambing PE *Post Thawing*

Pemeriksaan semen kambing PE *post thawing* yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi. Pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dilakukan untuk menghitung jumlah spermatozoa yang motil dalam sampel. Karakteristik semen *post thawing* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kualitas semen kambing PE *post thawing*

No	Variabel	Rata - rata $\pm$ SD
1	Motilitas massa	2+
2	Motilitas individu	59,65 $\pm$ 5,79 %
3	Viabilitas	68,07 $\pm$ 10,09 %
4	Abnormalitas	6,14 $\pm$ 2,14 %
5	Konsentrasi	200,2 $\pm$ 8,36 juta/ml

Pengamatan motilitas spermatozoa menunjukkan bahwa semen tersebut mempunyai kualitas yang baik karena motilitas individu rata-rata 59,65 $\pm$ 5,79% dan motilitas

massa baik (2+). Penilaian motilitas spermatozoa yang progresif sangat penting untuk menunjukkan kualitas individu ternak. Gerak massa spermatozoa yang normal berkisar antara 2+ dan 3+. Hasil pemeriksaan semen *post thawing* menunjukkan rata-rata motilitas individu adalah $59,65 \pm 5,79\%$ yang berarti bahwa motilitas individu tersebut masih dalam kisaran baik dan sesuai dengan pendapat Hafez (2000) yang menyatakan bahwa semen yang normal memiliki motilitas di atas 50%. Dengan rata-rata motilitas individu sebesar $59,65 \pm 5,79\%$ menunjukkan semen beku yang telah di *thawing* tersebut masih layak untuk diproses lebih lanjut.

Viabilitas spermatozoa dari hasil pemeriksaan semen *post thawing* diperoleh rata-rata $68,07 \pm 10,09\%$. Rata-rata viabilitas spermatozoa tersebut telah memenuhi syarat sebagai semen normal sehingga bisa diproses lebih lanjut. Ax *et al.*, (2000) menyatakan bahwa semen yang normal biasanya mempunyai viabilitas minimum sebesar 50%.

Persentase abnormalitas spermatozoa semen *post thawing* adalah $6,14 \pm 2,14\%$. Abnormalitas spermatozoa ini masih dalam kisaran normal sesuai dengan standart bahwa spermatozoa yang abnormal tidak boleh lebih dari 10%, karena mempengaruhi fertilitas (Zenichiro *et al.*, 2002).

Evaluasi Semen Kambing PE Setelah Sentrifugasi

Evaluasi semen kambing setelah perlakuan (sentrifugasi) meliputi pemeriksaan motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi spermatozoa. Adanya gaya sentrifugal yang ditimbulkan akibat sentrifugasi menyebabkan semen terpisah antara yang bagian padat (*pellet*) dan bagian yang cair.

Motilitas Spermatozoa

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi mengalami penurunan dibandingkan persentase

motilitas spermatozoa *post thawing* atau sebelum disentrifugasi pada lapisan atas dan lapisan bawah untuk P0, P1, dan P3. Akan tetapi persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan pada P2 mengalami peningkatan. Peningkatan ini diduga karena spermatozoa menemukan medium yang cocok setelah sebelumnya terjadi *shock* pada saat *thawing*. Persentase motilitas spermatozoa baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah (Tabel 2) menunjukkan hasil yang berbeda pada tiap perlakuan.

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa tertinggi adalah pada lapisan atas P2. Persentase motilitas spermatozoa lapisan bawah lebih tinggi daripada lapisan atas yaitu sebesar $59,18 \pm 7,20\%$ untuk lapisan atas dan $59,73 \pm 6,06\%$ untuk lapisan bawah. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kecepatan sentrifugasi memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan terhadap persentase motilitas spermatozoa kambing PE, baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah.

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa yang terdapat pada lapisan atas tidak jauh berbeda, akan tetapi secara keseluruhan persentase tersebut akan menghasilkan nilai lebih besar untuk yang lapisan bawah. Pada dasarnya nilai persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan sentrifugasi mengalami penurunan, kecuali untuk P2 motilitasnya mengalami peningkatan. Susilawati (2003) menyatakan bahwa penurunan persentase motilitas spermatozoa terjadi karena spermatozoa terpisah dengan seminal plasma dan terdapatnya gaya sentrifugal yang menyebabkan terjadinya gesekan antara medium dan spermatozoa. Gadea *et al.* (2005) menambahkan bahwa pencucian spermatozoa dengan sentrifugasi adalah metode yang relatif efektif untuk melindungi spermatozoa dari bahan-bahan yang dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa. Akan tetapi bagaimanapun juga proses sentrifugasi ini dapat menyebabkan perubahan-

Tabel 2. Persentase motilitas spermatozoa pada berbagai kecepatan sentrifugasi

Perlakuan (rpm)	Lapisan Atas (%)	Lapisan Bawah (%)
P0 (0 / kontrol)	$56,27 \pm 5,88^a$	$57,08 \pm 1,77^a$
P1 (1000)	$55,72 \pm 3,55^a$	$55,59 \pm 3,99^a$
P2 (1500)	$69,55 \pm 3,35^b$	$68,63 \pm 3,88^b$
P3 (2000)	$55,19 \pm 2,72^a$	$57,61 \pm 2,20^a$
Rata-rata	$59,18 \pm 7,5$	$59,73 \pm 6,06$

^{a, b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

perubahan spermatozoa, baik perubahan yang positif maupun negatif. Salah satu perubahan yang positif adalah bahwa sentrifugasi berguna untuk mendapatkan spermatozoa yang motil (Anonimus, 2004). Sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm memberikan persentase motilitas spermatozoa tertinggi baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah.

Viabilitas Spermatozoa

Rata-rata hasil pengamatan persentase viabilitas pada berbagai perlakuan kecepatan sentrifugasi disajikan pada Tabel 3.

Persentase viabilitas spermatozoa tertinggi adalah percobaan tanpa sentrifugasi atau kontrol pada lapisan atas $74,72 \pm 6,40\%$ dan percobaan kecepatan sentrifugasi 1500 rpm pada lapisan bawah $77,44 \pm 1,08\%$. Persentase viabilitas spermatozoa lapisan atas secara keseluruhan pada berbagai kecepatan sentrifugasi menunjukkan nilai yang lebih rendah dibandingkan dengan lapisan bawah, yaitu $67,28 \pm 9,77$ dan $72,71 \pm 8,50\%$. Nilai persentase viabilitas setelah perlakuan jika mengacu pada pendapat Hafez (2000) bahwa persentase viabilitas spermatozoa harus lebih dari 50%, maka masih berada dalam kisaran normal dan layak untuk digunakan lebih lanjut di dalam rangkaian proses fertilisasi in vitro. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kecepatan sentrifugasi memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan terhadap persentase viabilitas spermatozoa kambing PE pada lapisan atas tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) pada lapisan bawah.

Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa lapisan bawah lebih tinggi daripada lapisan atas. Persentase viabilitas spermatozoa tertinggi didapat pada percobaan kecepatan sentrifugasi 1500 rpm lapisan bawah. Sesuai dengan tingginya persentase motilitas spermatozoa pada lapisan bawah, maka persentase viabilitas pada lapisan bawah juga tinggi. Hal ini menunjukkan adanya

hubungan antara viabilitas dengan motilitas spermatozoa (Matthej, 1999). Adanya persentase viabilitas yang lebih tinggi pada lapisan bawah diduga pada lapisan bawah jumlah spermatozoanya lebih banyak dibandingkan dengan lapisan atas dan spermatozoa ini berada pada medium TCM-199 yang salah satu komponennya adalah asam amino yang berfungsi mempertahankan daya tahan atau daya hidup spermatozoa (Freshney, 1987). Jumlah spermatozoa lebih banyak pada lapisan bawah karena adanya perlakuan sentrifugasi yang menyebabkan semen terpisah antara supernatan dan pelet. Perlakuan inkubasi dalam inkubator CO_2 5% memungkinkan spermatozoa bergerak naik ke atas (*swim up*) sehingga pada lapisan atas juga terdapat spermatozoa. Susilawati (2003) menyatakan spermatozoa yang mati dan memiliki motilitas rendah akan tetap berada di lapisan atas sehingga persentase hidupnya rendah.

Persentase viabilitas spermatozoa setelah perlakuan mengalami peningkatan dibandingkan sebelum perlakuan, terutama pada lapisan bawah. Adanya nilai persentase viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi setelah perlakuan terjadi karena proses sentrifugasi berfungsi untuk menghilangkan faktor-faktor yang dapat menghambat fertilitas, termasuk daya hidup spermatozoa. Jadi dengan adanya perlakuan sentrifugasi, spermatozoa dapat memperoleh lingkungan yang bebas dari faktor penghambat tersebut, sehingga daya hidupnya dapat lebih tinggi. Supernatan yang dibuang dimungkinkan mengandung faktor-faktor penghambat tersebut, sehingga viabilitas spermatozoa setelah perlakuan menghasilkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan viabilitas spermatozoa awal. Hal ini sesuai dengan pendapat Rijsselaere *et al.* (2002) yang menyatakan bahwa sentrifugasi adalah metode pemisahan spermatozoa dari seminal plasma, fungsi sentrifugasi pada dasarnya adalah untuk mencuci spermatozoa sehingga faktor-faktor yang dapat mengganggu kualitas spermatozoa dapat dihilangkan.

Tabel 3. Persentase viabilitas spermatozoa pada berbagai kecepatan sentrifugasi

Perlakuan (rpm)	Lapisan Atas (%)	Lapisan Bawah (%)
P0 (0 / kontrol)	$74,72 \pm 6,40^a$	$73,40 \pm 9,77$
P1 (1000)	$62,99 \pm 5,87^{ab}$	$70,05 \pm 7,47$
P2 (1500)	$73,99 \pm 4,36^a$	$77,44 \pm 1,08$
P3 (2000)	$57,39 \pm 9,22^b$	$69,93 \pm 11,98$
Rata-rata	$67,28 \pm 9,77$	$72,71 \pm 8,5$

^{a, ab} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Tabel 4. Persentase abnormalitas spermatozoa pada berbagai kecepatan sentrifugasi

Perlakuan (rpm)	Lapisan Atas (%)	Lapisan Bawah (%)
P0 (0 / kontrol)	3,75±1,62 ^a	5,64±2,50 ^a
P1 (1000)	7,19±3,64 ^a	10,36±6,20 ^a
P2 (1500)	8,84±2,65 ^a	9,55±3,27 ^a
P3 (2000)	6,40±3,00 ^a	8,09±2,80 ^a
Rata-rata	8,41±4,09	6,55±3,21

^a. Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0,05$)

Abnormalitas Spermatozoa

Rata-rata hasil pengamatan Persentase abnormalitas pada berbagai perlakuan kecepatan sentrifugasi disajikan pada Tabel 4.

Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa tertinggi lapisan atas terdapat pada perlakuan ke-2 yaitu sebesar 8,84±2,65%, sedangkan pada lapisan bawah, persentase abnormalitas tertinggi didapat dari P-1 yaitu sebesar 10,36±6,20%. Persentase abnormalitas spermatozoa sebesar 6,55±3,21% untuk lapisan atas dan 8,41±4,09% untuk lapisan bawah. Peningkatan persentase abnormalitas terjadi pada abnormalitas sekunder yaitu abnormalitas yang terjadi bukan karena kelainan pada saat spermatogenesis, tetapi abnormalitas yang terjadi karena faktor-faktor di luar tubuh ternak jantan. Abnormalitas yang ditemukan berupa kepala tanpa ekor, ekor patah, ekor melingkar..

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kecepatan sentrifugasi memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antar perlakuan terhadap persentase abnormalitas spermatozoa kambing PE baik lapisan atas maupun lapisan bawah. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa lapisan bawah lebih tinggi daripada lapisan atas. Persentase abnormalitas spermatozoa tertinggi didapat pada percobaan kecepatan sentrifugasi 1500 rpm untuk lapisan atas yaitu sebesar 8,84±2,65% dan untuk lapisan bawah

Persentase abnormalitas tertinggi didapat pada percobaan kecepatan sentrifugasi 1000 rpm yaitu 10,36±6,20%. Peningkatan persentase abnormalitas pada lapisan bawah disebabkan jumlah spermatozoa pada lapisan ini lebih banyak daripada lapisan atas, sehingga gesekan antar spermatozoa dan antara spermatozoa dengan dinding tabung lebih banyak terjadi. Rouge *et al.* (2002) menyatakan bahwa peningkatan abnormalitas spermatozoa terjadi karena pengaruh suhu ataupun media pengencer. Selain itu peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa sesudah diberi perlakuan sentrifugasi dikarenakan adanya gaya sentrifugal yang berpengaruh pada fisiologis spermatozoa khususnya pada keutuhan spermatozoa dan terganggunya fungsi membran plasma.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa kecepatan sentrifugasi tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) antar perlakuan terhadap konsentrasi spermatozoa kambing PE baik lapisan atas maupun lapisan bawah. Konsentrasi spermatozoa tertinggi untuk lapisan atas adalah pada perlakuan kontrol atau tanpa disentrifugasi dan kecepatan sentrifugasi 1000 rpm yaitu sebesar 32,8±5,22 juta/ml. Pada lapisan bawah, konsentrasi spermatozoa tertinggi diperoleh dari P1 (kecepatan sentrifugasi 1000 rpm) yaitu sebesar 126,4±10,04 juta/ml. Adanya perbedaan rata-rata konsentrasi spermatozoa antara lapisan atas dan bawah dikarenakan setelah perlakuan sentrifugasi bagian bawah (pelet) mengandung

Tabel 5. Konsentrasi spermatozoa pada berbagai kecepatan sentrifugasi

Perlakuan (rpm)	Lapisan Atas (%)	Lapisan Bawah (%)
P0 (0 / kontrol)	32,8 ^a	106,4 ^a
P1 (1000)	32,8 ^a	126,4 ^a
P2 (1500)	31,2 ^a	110,4 ^a
P3 (2000)	29,6 ^a	120,0 ^a

^a. Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0,05$)

lebih banyak spermatozoa. Pada lapisan atas hanya spermatozoa yang memiliki motilitas cukup tinggi yang sanggup bergerak naik (*swim up*) ke arah lapisan atas. Riasa (2003) dan Den Daas (2002) dalam penelitiannya menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa pada lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan atas dikarenakan adanya gaya sentrifugal pada perlakuan sentrifugasi dan adanya gaya gravitasi bumi, sehingga menyebabkan spermatozoa mengalami daya tarik bumi akibatnya spermatozoa berkumpul di bawah. Total spermatozoa yang motil pada tiap lapisan disajikan pada Tabel 6.

Rata-rata total spermatozoa motil pada lapisan atas lebih rendah dibandingkan lapisan bawah. Hal ini dapat dipahami bahwa rendahnya konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas menyebabkan total spermatozoa motil dalam sampel juga rendah. Hanya spermatozoa yang memiliki motilitas cukup tinggi yang dapat mencapai lapisan atas, sehingga tidak semua spermatozoa dapat bermigrasi (*swim up*) menuju lapisan atas.

Rendahnya total spermatozoa motil pada lapisan atas menjadi pertimbangan pemakaian spermatozoa pada lapisan ini di dalam proses fertilisasi *in vitro*, karena walaupun jumlahnya sedikit, tapi dapat sebagian besar dipastikan spermatozoa pada lapisan ini memiliki motilitas yang cukup tinggi, dengan adanya bukti bahwa spermatozoa di lapisan ini berasal dari spermatozoa di lapisan bawah yang mampu bergerak ke atas selama inkubasi. Jumlah spermatozoa yang sedikit tidak menjadi masalah, bahkan dengan adanya jumlah spermatozoa yang lebih sedikit dapat mengurangi risiko kejadian polispermi pada saat fertilisasi *in vitro*. Ito dan Kita (2000) menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa yang tinggi selama proses fertilisasi *in vitro* menyebabkan tingginya kejadian polispermi. Tingginya kejadian polispermi juga berkaitan dengan perubahan konsentrasi spermatozoa akibat adanya gaya sentrifugal dalam proses sentrifugasi.

Persentase motilitas individu spermatozoa dapat dilihat bahwa motilitas tersebut mengalami penurunan antara *post thawing* dan setelah perlakuan lapisan atas, namun sedikit mengalami kenaikan pada persentase motilitas individu spermatozoa lapisan bawah. Adanya kenaikan persentase motilitas individu setelah perlakuan pada lapisan bawah diduga karena spermatozoa telah terpisah dengan faktor-faktor yang dapat mengganggu fertilisasi yang berasal dari seminal plasma serta kotoran-kotoran lain yang mungkin mengkontaminasi semen selama perlakuan di dalam laboratorium. Anonimus (2004) menyatakan bahwa fungsi dari pencucian spermatozoa dengan jalan sentrifugasi adalah untuk memperoleh spermatozoa yang motil dengan memisahkannya dari seminal plasma dan kotoran-kotoran yang terikut.

Persentase viabilitas spermatozoa menunjukkan nilai yang menurun antara spermatozoa *post thawing* dengan yang telah diberi perlakuan di lapisan atas, tetapi mengalami peningkatan pada lapisan bawah. Peningkatan ini terjadi karena spermatozoa diberi medium sentrifugasi berupa TCM-199 yang dapat mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa sebab mengandung asam amino. Sedangkan pada saat proses *thawing*, semen sedikit banyak mengalami shock dan tidak ditambahkan medium yang berupa TCM-199. Persentase abnormalitas spermatozoa dapat dilihat bahwa spermatozoa rata-rata mengalami peningkatan abnormalitas. Abnormalitas spermatozoa tertinggi didapat pada lapisan bawah setelah diberi perlakuan.

Konsentrasi spermatozoa *post thawing* memiliki nilai tertinggi dibandingkan dengan konsentrasi spermatozoa setelah diberi perlakuan, baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah. Nilai konsentrasi yang menurun ini diduga disebabkan supernatan yang dibuang pada prosedur penelitian mengandung spermatozoa, sehingga sebagian spermatozoa terbuang.

Tabel 6. Total spermatozoa motil pada tiap lapisan

Perlakuan (rpm)	Lapisan Atas (sp/ml)	Lapisan Bawah (sp/ml)
P0 (0 / kontrol)	18.456.560	60.733.120
P1 (1000)	18.276.160	70.265.760
P2 (1500)	21.699.600	75.767.520
P3 (2000)	16.336.240	69.132.000

Nilai konsentrasi spermatozoa lapisan bawah yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi spermatozoa lapisan atas disebabkan karena jumlah spermatozoa lapisan bawah lebih banyak. Proses sentrifugasi akan menyebabkan spermatozoa terpisah menjadi dua bagian, bagian atas dan bagian bawah (pelet), dengan kandungan spermatozoa yang lebih banyak pada lapisan bawah. Riasa (2003) dalam penelitiannya menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa pada lapisan bawah lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan atas dikarenakan adanya gaya sentrifugal pada perlakuan sentrifugasi dan adanya gaya gravitasi bumi, sehingga menyebabkan spermatozoa mengalami daya tarik bumi akibatnya spermatozoa berkumpul di bawah.

KESIMPULAN

Kecepatan sentrifugasi sebesar 1500 rpm menghasilkan persentase motilitas dan viabilitas sperma tertinggi baik pada lapisan atas maupun lapisan bawah.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2004. Sperm Washing. <http://www.fertilitydirectory.org/sperm-washing-html-38k-supplemental-result>.
- Ax, R.L, M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D Varner, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2000. Semen Evaluation. In **Reproduction In Farm Animals**. 7th ed, (E.S.E. Hafez). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Den Daas, N. 1992. Laboratory Assessment of Semen Characteristic. In **Clinical Trends and Basic Research in Animal Reproduction**. (S.J. Dieleman, B. Colenbrander, P.Booman, and T. Van Der Lende). Elsevier Science Publisher BV. Amsterdam.
- Gadea, J, S. Martinez, G.Decuardo-Hansen, and C. Matas. 2005. Evaluation of Boar Sperm Functionality After A Cushioned Centrifugation Technique. <http://www.fertilitydirectory.org>.
- Hafez, B. 2000. Micromanipulation of Gametes and Embryos: In-Vitro Fertilization and Embryo Transfer (IVF/ET). In **Reproduction In Farm Animals**. 7th ed. (E.S.E. Hafez). Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Ito, M. and S. Kita. 2000. Effect of centrifugal gravity on the fertilization and early development of mammals. *Journal Mammalian. Ova Research*. 17: 84-89.
- Mattheij, J.A.M, T. Van der Lende, dan A. Osinga. 1999. **Reproduksi dan Dasar-Dasar Endokrinologi Pada Hewan-Hewan Ternak**. NUFFIC-UNIBRAW. Malang.
- Riasa, E. 2003. Pengaruh Tingkat Pengenceran Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Limousin Hasil Sexing dengan Metode Gradien Konsentrasi Putih Telur. **Skripsi**. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Rijsselaere, T, A. Van Soom, D. Maes, and A. de Kruif. 2002. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. *Theriogenology* 57(6): 1669-1681.
- Susilawati, T. 2003. **Penentuan dan Pengaturan Jenis Kelamin**. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Zenichiro, Kumada, Herliantien, dan Sarastina. 2002. **Instruksi Praktis Teknologi Processing Semen Beku Pada Sapi**. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari-JICA. Malang.