

**PENGARUH PENGGUNAAN HEMIKALSIUM DALAM
MEDIUM FERTILISASI *IN VITRO* TERHADAP VIABILITAS
DAN AGLUTINASI SPERMATOZOA SAPI**
[*The Usage effect of Hemicalcium in a Medium of In Vitro Fertilization
on Viability and Agglutination of Cattle Sperm*]

Z. Udin, Jaswandi, dan M. Hiliyati
Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi hemikalsium dalam medium fertilisasi *in vitro* terhadap viabilitas dan aglutinasi spermatozoa sapi. Semen dikoleksi dari epididimis sapi yang diambil dari Rumah Potong Hewan kota Padang. Hemikalsium yang digunakan sebagai perlakuan terdiri dari 4 level yaitu perlakuan A = 2,5 mM ; B = 5.0 mM; C = 7,5 mM dan D = 10 mM, serta 5 kelompok sebagai ulangan. Peubah yang diamati adalah motilitas, persen hidup spermatozoa dan aglutinasi spermatozoa. Rancangan yang dipakai untuk analisis data adalah rancangan acak kelompok, dengan uji wilayah ganda Duncan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rataan motilitas untuk perlakuan A; B; C; dan D masing-masing adalah 72% ; 74% ; 68% dan 62%. Rataan persentase spermatozoa hidup untuk perlakuan A; B; C dan D masing-masing 67,4 % ; 64,6% ; 70,2% dan 75,2%. Rataan aglutinasi spermatozoa pada perlakuan A; B; C dan D masing-masing adalah 12,5% ; 14,9% ; 18,1% dan 22,0%. Penggunaan hemikalsium dalam medium fertilisasi *in vitro* berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas dan aglutinasi spermatozoa sapi.

Kata kunci : fertilisasi, in vitro, semen, aglutinasi, epididimis

ABSTRACT

This research studied the effect of hemicalcium concentration in a medium of the *in vitro* fertilization to viability and agglutination of cattle sperm. Semen was collected from epididymis obtained from the slaughter house in Padang City. The treatment was hemicalcium concentration in the modified Brackett-Oliphant media (m B-O) at 4 different levels : A= 2.5 m M; B = 5.0 m M; C = 7.5 m M and D = 10 m M with 5 replications. The semen was cultured at 38 °C in 24 hours to study the sperm motility, live sperm and sperm agglutination. A randomized block design was used to arrange the treatments, and data were tested using ANOVA and Duncan's multiple range test.

The percentage of sperm motility in the treatment of A, B, C, and D were 72 ; 74; 68 and 62 %, respectively. The averages of percentage live sperm in treatment A ; B; C and D were 67.4; 64.6; 70.2 and 75.2%, respectively. The averages of sperm agglutination in treatment A; B; C; and D were 12.5 ; 14.9 ; 18.1 ; 22.0%, respectively. The hemicalcium concentration in the medium of *in vitro* fertilization affected ($P < 0.01$) sperm motility, sperm live and sperm agglutination.

Keywords : in vitro fertilization, semen, agglutination, epididymis

PENDAHULUAN

Pemanfaatan dan pengembangan teknik transfer embrio dapat dilakukan melalui fertilisasi *in vitro* (FIV) untuk memproduksi embrio dalam jumlah yang banyak. Produksi embrio secara *in vitro* ini sudah banyak dilakukan pada berbagai spesies ternak seperti sapi (Trounson *et al.*, 1994) dan kerbau (Totey *et al.*, 1993). Bahan yang digunakan sebagai sumber gamet untuk FIV dapat berasal dari hewan yang masih hidup maupun dari hewan yang sudah dipotong atau mati. Epididimis hewan yang telah dipotong dapat digunakan sebagai sumber spermatozoa. Namun demikian potensi epididimis sebagai sumber gamet belum semuanya dimanfaatkan untuk dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa dalam waktu yang lama.

Fertilisasi *in vitro* merupakan suatu teknik penetrasi oosit oleh spermatozoa yang terjadi di luar tubuh dalam suatu biakan sel mencakup maturasi oosit dan kapasitasi spermatozoa *in vitro*. Medium yang digunakan untuk kapasitasi masih perlu dimodifikasi untuk mendapatkan hasil FIV yang lebih baik. Salah satu usaha yang dilakukan pada teknik FIV adalah mencoba memodifikasi medium yang digunakan untuk meningkatkan viabilitas spermatozoa sehingga mampu membuahi sel telur. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa penambahan beberapa stimulan dalam medium seperti kafein, heparin dan hemikalsium dapat memperbaiki keberhasilan fertilisasi *in vitro* (Niwa dan Ohgoda, 1988 ; De Smedt *et al.*, 1992; Le Gal, 1996) pada ternak kambing.

Penggunaan hemikalsium telah berhasil digunakan, terutama oleh ilmuwan Jepang pada tahap awal jalan kapasitasi dari sperma sapi jantan langsung meningkatkan kandungan Ca^{2+} dan

menyebabkan reaksi akrosom (Hanada, 1985). Untuk stimulan sperma sapi dalam fertilisasi *in vitro* belum ada hasil penelitian yang dilaporkan.

Berdasarkan uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian penggunaan hemikalsium dalam medium fertilisasi *in vitro*. Tujuan penelitian ini untuk membandingkan penggunaan hemikalsium dalam medium fertilisasi terhadap viabilitas spermatozoa dan aglutinasi spermatozoa sapi.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan secara eksperimen di laboratorium Fisiologi Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang. Sebagai perlakuan adalah 4 dosis hemikalsium yang terdiri dari A= 2,5 mM B= 5,0 mM; C= 7,5 mM dan D= 10 Mm dalam medium mB-O dan lima ulangan sebagai kelompok. Epididimis yang diambil dari RPH dibawa dengan termos yang berisi larutan NaCl fisiologis. Semen dikeluarkan dengan mengiris bagian cauda epididimis dan ditekan sampai semen keluar yang ditampung dengan test tube dan diperiksa kualitas spermatozoa.

Kapasitasi spermatozoa dilakukan dengan menggunakan modifikasi medium Brackett Oliphant (m B-O) yang ditambahkan dengan hemikalsium sesuai dengan perlakuan. Sebanyak 1 ml medium ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 250 μ l semen lalu diinkubasi pada temperatur 38 °C selama 30 menit. Kemudian disentrifugasi dan diambil sebanyak 500 μ l bagian atas dan diperiksa di bawah mikroskop untuk mengamati karakteristik spermatozoa.

Peubah yang diamati adalah motilitas, persentase hidup spermatozoa dan aglutinasi spermatozoa. Data dianalisis menggunakan sidik ragam sesuai rancangan acak kelompok dengan 4

Tabel 1. Rataan Motilitas Spermatozoa pada 4 Dosis Hemikalsium

Kelompok	Perlakuan dosis Hemikalsium (m M)				Rataan
	2,5 (A)	5,0 (B)	7,5 (C)	10,0 (D)	
	----- % -----				
I	70,0	70,0	60,0	65,0	65,0
II	70,0	80,0	70,0	60,0	70,0
III	70,0	70,0	60,0	60,0	65,0
IV	70,0	70,0	70,0	60,0	67,5
V	80,0	80,0	80,0	70,0	77,5
Rataan	72,0	74,0	68,0	62,0	

perlakuan dan lima kelompok, yang dilanjutkan dengan uji lanjut wilayah ganda Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas Spermatozoa

Rataan motilitas spermatozoa yang didapatkan dari 4 dosis hemikalsium yaitu A, B, C dan D dapat dilihat pada Tabel 1. Rataan motilitas yang terendah didapatkan pada perlakuan D (62 %) dan yang tertinggi pada perlakuan B (74 %).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis hemikalsium maka semakin rendah motilitas spermatozoa. Hal ini berkaitan dengan energi yang dikeluarkan karena aktivasi yang meningkat dan cepat pula menjadi immotil. Hasil analisa statistik juga menunjukkan bahwa pengaruh dosis hemikalsium sangat nyata ($P < 0,01$) menurunkan motilitas spermatozoa sapi. Demikian juga uji Duncan memperlihatkan bahwa motilitas spermatozoa sangat berbeda nyata ($P < 0,01$) untuk

antara perlakuan disebabkan karena adanya berbagai perubahan yang terjadi secara bersamaan diikuti oleh reaksi akrosom secara fisiologis pada keadaan adanya ion-ion kalsium bebas dan ekor spermatozoa yang bergetar hebat sebagai akibat dari hiperaktivasi motilitas sehingga fungsi atau penyatuan sel telur dengan spermatozoa dapat terjadi (Bedford, 1983 ; Trounson, 1992). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa perlakuan B (5,0) hemikalsium merupakan yang tertinggi motilitas spermatozoa.

Persentase Hidup Spermatozoa

Rataan persentase hidup spermatozoa sapi pada masing perlakuan A, B, C dan D dapat dilihat pada Tabel 2. Persentase hidup spermatozoa yang tertinggi didapatkan pada level hemikalsium yang tinggi yaitu pada perlakuan D (10mM) adalah 75,2 % dan yang terendah pada perlakuan B (5,0 mM) adalah 64,6 %.

Hasil analisis statistik menunjukkan

Tabel 2. Persentase Hidup Spermatozoa Sapi pada 4 Dosis Hemikalsium

Kelompok	Perlakuan dosis Hemikalsium (m M)				Rataan
	2,5 (A)	5,0 (B)	7,5 (C)	10,0 (D)	
I	68,0	63,0	72,0	78,0	70,2
II	65,0	60,0	65,0	72,0	65,5
III	67,0	65,0	64,0	68,0	66,0
IV	65,0	60,0	70,0	73,0	67,0
V	72,0	75,0	80,0	85,0	78,0
Rataan	67,4	64,6	70,2	75,2	

setiap perlakuan. Pada penelitian didapatkan bahwa dosis hemikalsium 5 mM sudah merupakan dosis yang baik untuk memacu motilitas spermatozoa. Di lain pihak peningkatan dosis hemikalsium akan menurunkan motilitas. Penambahan hemikalsium dalam larutan m B – O mempunyai fungsi meningkatkan daya gerak atau motilitas spermatozoa. Menurut Takahashi dan Hanada (1984) bahwa kalsium ionophore A2 1387 telah digunakan dalam mencapai pemasukan ekstrasellular Ca ke sperma pada proses kapasitas.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa perlakuan D (10mM) menghasilkan motilitas spermatozoa yang paling rendah. Hal ini menunjukkan dosis yang tinggi akan menyebabkan sperma aktif secara berlebihan dan cepat pula berhenti karena kekurangan energi yang dikandungnya. Perbedaan

bahwa pengaruh penambahan hemikalsium dalam medium m B-O sangat nyata ($P < 0,01$) meningkatkan persentase hidup spermatozoa. Uji Duncan juga memperlihatkan bahwa persentase hidup spermatozoa sangat berbeda nyata ($P < 0,01$) untuk semua perlakuan. Semakin tinggi level hemikalsium dalam medium pre inkubasi maka semakin tinggi persentase hidup spermatozoa. Hal ini disebabkan dosis yang tinggi menyebabkan daya tahan hidup spermatozoa lebih lama dan dapat membuahi sel telur secara *in vitro*. Disamping itu spermatozoa menjadi hiperaktif sehingga bergerak ke bagian atas tabung, namun demikian motilitas akan menjadi rendah. Ini sesuai dengan pendapat Bird *et al.* (1989) bahwa perlakuan kalsium menghasilkan hiperaktif dan fungsi reaksi akrosom sperma sapi, memungkinkan mereka menembus

daerah bebas oosit dalam fertilisasi. Dengan demikian penambahan hemikalsium dalam medium kapasitasi akan dapat meningkatkan persentase spermatozoa yang mengalami kapasitasi dan dapat meningkatkan hasil FIV.

Rendahnya persentase hidup spermatozoa pada perlakuan B mungkin disebabkan lebih sedikit sperma yang motil sehingga spermatozoa yang hidup juga sedikit. Namun demikian perlakuan B (64,6%) masih layak digunakan untuk FIV karena masih diatas standar yang ditetapkan yaitu 60 % (Partodiharjo, 1992). Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan D (10mM) hemikalsium memberikan persentase hidup sperma yang tinggi.

Aglutinas Spermatozoa

Rataan aglutinasi spermatozoa pada 4 dosis hemikalsium A (2,5), B (5,0), C (7,5) dan D (10) dapat dilihat pada Tabel 3. Rataan aglutinasi spermatozoa yang terendah didapatkan pada

bahwa sperma dan plasmanya memiliki semacam antigenik dan apabila disuntikan kedalam tubuh sehingga sel-sel ini akan membentuk antibodi di dalam darah, serum sehingga membentuk aglutinasi sperma.

Pada penelitian ini aglutinasi spermatozoa yang tertinggi didapatkan pada perlakuan D (10 mM) yaitu 22,0%. Angka ini sangat tinggi apabila dibandingkan dengan hasil yang didapatkan oleh De Smedt *et al.* (1992) yaitu 3,5%. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan sifat antibodi dari kedua spesies. Oleh karena itu sperma dan plasma sapi, domba, dan babi berisi antibodi yang sanggup mengakibatkan aglutinasi spermatozoa. Demikian juga interaksi antara sperma dan ovum pada permulaan fertilisasi juga dipengaruhi oleh mekanisme antigen antibodi, suatu reaksi yang spesifik untuk menolak dan menerima. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa semakin tinggi dosis hemikalsium maka semakin tinggi aglutinasi dan semakin berkurang peluang sperma untuk

Tabel 3. Rataan Persentase Aglutinasi Spermatozoa pada 4 Dosis Hemikalsium

Kelompok	Perlakuan dosis Hemikalsium (m M)				Rataan
	2,5 (A)	5,0 (B)	7,5 (C)	10,0 (D)	
	----- % -----				
I	11,5	10,0	17,5	17,5	14,1
II	6,5	9,5	11,0	15,0	10,4
III	17,0	23,0	20,0	28,5	22,1
IV	15,0	17,0	19,0	28,0	19,7
V	12,5	15,5	23,0	21,0	18,0
Rataan	12,5	14,9	18,1	22,0	

perlakuan A (12,5 %) dan yang tertinggi didapatkan pada perlakuan D (22,0 %).

Hasil analisis Statistik mendapatkan bahwa dosis hemikalsium sangat nyata ($P < 0,01$) meningkatkan aglutinasi spermatozoa sapi. Uji Duncan memperlihatkan persentase aglutinasi spermatozoa berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) untuk semua perlakuan. Pada penelitian ini terlihat semakin tinggi dosis hemikalsium maka semakin tinggi aglutinasi spermatozoa sapi. Hal ini menunjukkan bahwa medium kapasitasi yang mengandung hemikalsium akan menyebabkan hiperaktif dan menyebabkan terjadinya pengumpulan kepala spermatozoa, sehingga tidak mampu membuahi sel telur. Oleh karena itu semakin tinggi aglutinasi maka semakin rendah kemampuan membuahi sel telur, atau semakin rendah angka fertilisasi. Menurut Toelihere (1985)

membuahi ovum.

KESIMPULAN

Persentase Motilitas spermatozoa yang tertinggi didapatkan pada perlakuan B (5,0 mM) hemikalsium dalam medium m B-O adalah 74 %. Persentase hidup spermatozoa tertinggi didapatkan pada perlakuan D (10 mM) hemikalsium dalam medium m B-O adalah 75,2 %. Persentase aglutinasi spermatozoa yang terendah didapatkan pada perlakuan A (2,5 mM) hemikalsium dalam medium m B-O adalah 12,5 %. Dosis hemikalsium berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas spermatozoa dan aglutinasi spermatozoa. Perlu dilakukan fertilisasi *in vitro* untuk mengukur kapasitasi dan angka fertilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bedford, J. M. 1983. Significant of the need for sperm capacitation before fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* 28 : 108 – 120.
- Bird, J. M, S. Cary and J.A. Houghton. 1989. Motility and acrosomal changes in ionophore treated bovine spermatozoa and their relationship with *in vitro* penetration of zona-free hamster oocyte. *Theriogenology* 32 : 227 – 247.
- De Smedt, V., N. Crozet , M. Ahmed Ali, A Martino and Y. Cognie. 1992. *In vitro* maturation of goat oocytes. *Theriogenology*. 37 : 1049 – 1060.
- Hanada, A. 1985. *In vitro* fertilization in cattle , with particular reference to sperm capacitation ionophore A23187. *Jpn. J. Anim. Prod.* 31: 56 – 61.
- Le Gal, F. 1996 *In vitro* maturation and fertilization of goat oocyte frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 45 : 1147 – 1185.
- Niwa, K. and O. Ohgoda. 1988. Synergistic effect of cafein and heparin on *in vitro* fertilization of cattle oocytes matured in culture . *Theriogenology* 30 : 733 – 741.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan Ketiga. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Takahashi, Y. and A. Hanada. 1984. Penetration of zona- free hamster eggs *in vitro* by ejaculated bull sperm after treatment with ionophore A23187. *Jpn. J. Anim. Prod.* 30(10) : 30 – 38.
- Toelihere, 1985. Fisiologi dan Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Totey, S.M., C.H. Pawshe and G.P. Singh. 1993. *In vitro* maturation and fertilitation of buffalo oocytes : Effect of media hormon and sera. *Theriogenology* 41: 56 – 66.
- Trounson, A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 28 : 127 – 137.
- Trounson, A.D. Pushett, L.J.Maclelan, I. Lewis and Gaedner. 1994. Current status of embryos culture in human and farm animals. *Theriogenology* 39 : 1153 – 1171.