

**VIABILITAS DAN KEUTUHAN MEMBRAN PLASMA SPERMATOZOA EPIDIDIMIS
KERBAU BELANG PADA PENAMBAHAN MALTOSA
DALAM PENGECER ANDROMED®**

**[The Viability and Membrane Integrity of Spotted Buffalo Epididymal Sperm
in Addition of Maltose into Andromed®Extender]**

Herdis ¹, M. Surachman¹, Yulnawati ², M. Rizal ³ dan H. Maheshwari ⁴

¹ Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Jakarta

² Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong

³ Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Ambon

⁴ Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Received February 25, 2008; Accepted April 04, 2008

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa asal epididimis kerbau belang yang dibekukan pada pengencer Andromed® dengan penambahan maltosa. Sebagai kontrol (K), digunakan bahan pengencer komersial Andromed®, sedangkan sebagai perlakuan dilakukan penambahan maltosa 0,2 % (P1) dan 0,4% (P2) ke dalam pengencer Andromed®. Hasil penelitian menunjukkan persentase motilitas setelah thawing pada media P1 ($46,00 \pm 2,00$ %) tidak berbeda ($P > 0,05$) dengan perlakuan P2 ($44,00 \pm 2,00$ %) namun berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan K ($41,00 \pm 2,00$ %). Persentase hidup setelah thawing pada media P1 ($59,20 \pm 1,17$ %) tidak berbeda ($P > 0,05$) dengan perlakuan P2 ($60,60 \pm 1,62$ %) namun berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan K ($52,20 \pm 2,48$ %). Sementara itu penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) pada keutuhan membran plasma spermatozoa pada ketiga tahap proses pembekuan dalam ketiga media pengencer yang digunakan. Dapat disimpulkan bahwa penambahan maltosa ke dalam media Andromed® dapat mempertahankan viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang setelah thawing.

Kata kunci: Viabilitas, Membran plasma, Sperma epididimis, Maltosa, Kerbau Belang

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the viability and membrane integrity of spotted buffalo epididymal sperm. Andromed® was used as control extender and the combination of Andromed® with 0.2% (P1) and 0.4 % (P2) maltose were used for the treatments. The results showed that the percentage of motility after thawing in P1 media (46.00 ± 2.00 %) was not significantly different ($P > 0.05$) from P2 (44.00 ± 2.00 %), but there was significantly different ($P < 0.05$) from K (41.00 ± 2.00 %). The percentage of live sperm after thawing in P1 (59.20 ± 1.17 %) was not significantly different ($P > 0.05$) from P2 (60.60 ± 1.62 %), but significantly different ($P < 0.05$) from K (52.20 ± 2.48 %). There was no significantly different ($P > 0.05$) in the percentage of membrane integrity of spotted buffalo epididymal sperm at the three stages of cryopreservation process in the three different extenders. In conclusion, the addition of maltose into Andromed® could maintain the viability and membrane integrity of spotted buffalo epididymal sperm after thawing.

Keywords: Viability, Plasma membrane, Epididymal sperm, Maltose, Spotted buffalo

PENDAHULUAN

Populasi kerbau belang (*Bubalus bubalis*) di Tana Toraja, Sulawesi Selatan, terus mengalami penurunan drastis setiap tahunnya. Jenis ternak ini merupakan salah satu spesies kerbau khas dan dipercaya hanya hidup dan berkembang di daerah tersebut saja. Performans kerbau belang relatif lebih besar dengan bobot badan rata-rata lebih tinggi dibandingkan kerbau rawa lainnya. Kerbau belang digunakan oleh masyarakat setempat sebagai hewan persembahan pada berbagai upacara adat seperti acara pemakaman, perkawinan, dan sebagainya. Seekor kerbau belang jantan yang digunakan pada upacara adat tersebut memiliki nilai ekonomis yang sangat tinggi, mencapai angka ratusan juta rupiah.

Seorang peternak yang memiliki kerbau belang dianggap mendapat keberuntungan, sehingga peternak tersebut akan menjaga dan memelihara ternaknya dengan perlindungan yang berlebihan serta tidak membiarkan hewan jantannya melakukan aktivitas reproduksi. Mereka menganggap jika seekor kerbau belang jantan telah melakukan aktivitas reproduksi melalui kawin alam, maka hewan tersebut menjadi liar dan sulit dikendalikan. Akibatnya mereka memelihara kerbau belang jantan secara terpisah dari kerbau betina. Keadaan ini berakibat kurang baik pada perkembangbiakan kerbau belang.

Permintaan akan kerbau belang yang terus menerus sepanjang tahun dengan populasi yang semakin menyusut menyebabkan perlu adanya langkah antisipatif untuk menghindari kepunahan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan menerapkan teknologi reproduksi bantuan. Inseminasi buatan (IB) menggunakan spermatozoa yang berasal dari kerbau belang jantan yang ditampung menggunakan vagina buatan merupakan salah satu alternatif usaha. Tetapi apabila upaya ini mendapat hambatan dari pemilik ternak, maka cara lain yang dapat dilakukan untuk mengkoleksi spermatozoa kerbau belang adalah dengan memanfaatkan epididimis yang berasal dari kerbau belang yang dikorbankan pada upacara adat.

Pada beberapa jenis spesies hewan, seperti kucing (Yulnawati dan Setiadi 2005; Tsutsui *et al.* 2003), anjing (Setiadi *et al.* 2006; Hori *et al.* 2004), mencit (Sankai *et al.* 2001) dan domba (Rizal *et al.* 2004), epididimis merupakan sumber spermatozoa potensial

yang dapat disimpan sampai jangka waktu tak terbatas. Secara anatomis epididimis memang berfungsi sebagai tempat pematangan dan penyimpanan spermatozoa sebelum diejakulasikan. Spermatozoa epididimis ini diketahui telah dapat digunakan untuk melakukan proses fertilisasi seperti halnya spermatozoa hasil ejakulasi (Hafez dan Hafez 2000).

Secara fisiologis, spermatozoa epididimis sedikit berbeda dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Untuk itu perlu penelitian mengenai bahan pengencer yang tepat untuk pengenceran dan penyimpanan spermatozoa epididimis. Salah satu bahan pengencer komersial yang biasa digunakan untuk spermatozoa hasil ejakulasi dan epididimis sapi adalah Andromed® (Minitub 2001). Andromed® merupakan pengencer komersial dasar mengandung Tris sebagai buffer dan bebas protein hewani. Penelitian sebelumnya yang menggunakan spermatozoa epididimis kerbau Afrika (*Syncerus caffer*) dalam bahan pengencer Andromed® dan Triladyl™ menunjukkan hasil bahwa tidak ada perbedaan nyata pada kualitas spermatozoa post thawing dalam kedua bahan pengencer tersebut, walaupun Triladyl™ menunjukkan nilai yang relatif lebih baik daripada Andromed® (Herold *et al.* 2006; Herold *et al.* 2004). Oleh karena itu, maka dilakukan penelitian mengenai upaya peningkatan efektifitas Andromed® sebagai bahan pengencer spermatozoa epididimis kerbau belang dengan melakukan penambahan maltosa sebagai krioprotektan ekstraseluler untuk meningkatkan viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis setelah pencairan kembali (thawing).

METODE PENELITIAN

Pasangan epididimis diperoleh pada saat pemotongan kerbau belang di upacara pemakaman Rambu Solo' di desa Pangli, Kecamatan Rante Pao, Tana Toraja. Epididimis disimpan dan dibilas dengan larutan NaCl fisiologis (0,9%). Spermatozoa dikoleksi dari cauda epididimis dengan kombinasi teknik penyayatan, pembilasan dan penekanan pada setiap jaringan cauda (Rizal, 2006) menggunakan larutan Andromed® sebagai media pengencer dasar. Evaluasi terhadap hasil koleksi dilakukan meliputi persentase

motilitas, hidup, konsentrasi, abnormalitas dan membran plasma utuh (MPU). Spermatozoa disentrifugasi dengan kecepatan 500 G selama 20 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang dan sedimen diencerkan kembali dengan media pengencer Andromed®.

Sebagai media kontrol, digunakan Andromed® yang diencerkan dengan aquabidestilata dengan perbandingan 1:4. Sebagai perlakuan dilakukan penambahan maltosa dengan dosis 0,2 dan 0,4 % ke dalam medium pengencer Andromed®.

Spermatozoa epididimis yang telah diencerkan dikemas di dalam straw mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 200 juta sperma motil per straw, kemudian diekuilibrasi di dalam lemari es bersuhu 5°C selama 3 jam. Selanjutnya straw diletakkan di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130°C) setinggi 10 cm selama 15 menit. Kemudian straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu -196°C) dan disimpan dalam kontainer. Setelah disimpan, masing-masing sampel spermatozoa epididimis beku dicairkan kembali (thawing) untuk dievaluasi kualitasnya. Thawing dilakukan dengan cara memasukkan straw ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik.

Peubah kualitas spermatozoa epididimis yang diamati adalah: persentase motilitas, persentase sperma hidup, dan persentase MPU masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasi dan thawing.

Persentase motilitas spermatozoa dihitung secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Evaluasi terhadap persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarnaan eosin 2%. Spermatozoa hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah (Toelihere, 1993). Membran plasma utuh (MPU) ditandai oleh ekor sperma yang melingkar atau menggembung,

sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit (Revell dan Mrode, 1994). Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x untuk masing-masing peubah yang dievaluasi.

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam (ANOVA) dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi spermatozoa yang terdapat pada cauda epididimis kerbau belang sebesar $1044,50 \times 10^9$ sperma/ml. Sementara itu, konsentrasi spermatozoa yang terdapat pada ejakulat kerbau berkisar antara $500-1500 \times 10^6$ sperma/ml (Hafez dan Hafez 2000). Konsentrasi spermatozoa dalam cauda epididimis sangat padat karena belum mendapat penambahan plasma semen yang dihasilkan oleh kelenjar asesoris di sepanjang jalur pengeluaran spermatozoa sebelum ejakulasi.

Persentase abnormalitas spermatozoa yang terdapat pada bagian cauda epididimis kerbau belang sebesar $15,00 \pm 2,24$ %. Abnormalitas spermatozoa paling banyak ditemukan pada pengamatan ini adalah masih adanya cytoplasmic droplet pada bagian distal. Meskipun demikian, angka ini masih berada dalam kisaran normal abnormalitas spermatozoa yang layak digunakan proses fertilisasi. Rataan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang secara umum terdapat pada Tabel 1. Kualitas spermatozoa epididimis yang diamati memenuhi syarat untuk digunakan untuk diproses lebih lanjut untuk tujuan aplikasi IB.

Penelitian menunjukkan pada ketiga tahapan

Tabel 1. Kualitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang

Parameter	Hasil
Konsentrasi (10^9 sperma/ml)	$1044,50 \pm 43,62$
Motilitas progresif (%)	$65,00 \pm 0,00$
Hidup (%)	$79,25 \pm 1,30$
Abnormalitas (%)	$15,00 \pm 2,24$
Membran Plasma Utuh (MPU; %)	$80,75 \pm 0,43$

proses pembekuan spermatozoa, persentase motilitas cenderung mengalami penurunan (Tabel 2). Motilitas thawing pada media pengencer maltosa 0,2% ($59,20 \pm 1,17$ %) tidak berbeda ($P > 0,05$) dengan perlakuan

Tabel 2. Rataan dan Simpangan Baku Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang pada Tiga Tahapan Proses Pembekuan

Perlakuan	Pengenceran			Ekuilibrasi			Thawing		
	% M	% H-M	% MPU	% M	% H-M	% MPU	% M	% H-M	% MPU
Kontrol	65,00 ^a $\pm 0,00$	76,00 ^a $\pm 2,83$	78,67 ^a $\pm 0,47$	50,00 ^a $\pm 0,00$	70,33 ^a $\pm 0,47$	72,00 ^a $\pm 0,82$	41,00 ^a $\pm 2,00$	52,20 ^a $\pm 2,48$	68,00 ^a $\pm 1,10$
Maltosa 0,2%	65,00 ^a $\pm 0,00$	76,67 ^a $\pm 3,86$	80,33 ^a $\pm 2,49$	53,33 ^a $\pm 2,36$	72,00 ^a $\pm 1,63$	72,00 ^a $\pm 0,82$	44,00 ^b $\pm 2,00$	59,20 ^b $\pm 1,17$	69,20 ^a $\pm 1,60$
Maltosa 0,4%	65,00 ^a $\pm 0,00$	79,33 ^a $\pm 2,49$	80,67 ^a $\pm 0,94$	55,00 ^a $\pm 4,08$	72,33 ^a $\pm 0,94$	71,33 ^a $\pm 0,47$	46,00 ^b $\pm 2,00$	60,60 ^b $\pm 1,62$	68,00 ^a $\pm 1,47$

Keterangan: ^{a,b} Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

M = Motilitas; H-M = Hidup-Mati; MPU = Membran Plasma Utuh

spermatozoa epididimis kerbau belang post thawing dalam media pengencer maltosa 0,4% paling tinggi ($46,00 \pm 2,00$ %) tidak berbeda ($P > 0,05$) dengan perlakuan pengencer maltosa 0,2% ($44,00 \pm 2,00$ %) tetapi berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($41,00 \pm 2,00$ %). Hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan Herold et al. (2006) pada spermatozoa epididimis kerbau Afrika yang dibekukan dalam media Andromed® yakni sebesar 44 ± 17 %. Hasil ini menunjukkan bahwa Andromed® dapat dijadikan sebagai media pengencer dalam pembekuan spermatozoa asal epididimis kerbau belang.

Andromed® sebagai pengencer, mengandung lesitin yang berasal dari ekstrak kacang kedelai yang berperan penting pada proses pembekuan semen. D dilaporkan bahwa Andromed® mengandung lesitin yang cukup tinggi, yakni sebanyak 6.76 g/100 ml. Hasil penelitian Aku (2005) didapatkan bahwa disamping lesitin, Andromed® juga mengandung protein, karbohidrat, mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin, dan glyceryl phosphoryl choline (GPC). Seluruh bahan-bahan yang terkandung di dalam pengencer semen komersial Andromed® tersebut merupakan bahan-bahan yang telah umum digunakan dalam menyusun pengencer semen selama ini.

Persentase hidup spermatozoa dievaluasi dengan menggunakan zat warna diferensial eosin 2%. Penelitian menunjukkan persentase hidup setelah

pengencer maltosa 0,4% ($60,60 \pm 1,62$ %) namun berbeda nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($52,20 \pm 2,48$ %). Pada spermatozoa yang hidup, zat warna yang masuk akan dipompa kembali keluar sehingga spermatozoa terlihat berwarna putih atau jernih. Pada spermatozoa yang mati, kemampuan daya pompa dari sel sudah tidak berfungsi dengan baik sehingga zat warna tetap berada di dalam sel, dan sel spermatozoa terlihat berwarna merah.

Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme dan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup spermatozoa yang dihasilkan. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) pada keutuhan membran plasma spermatozoa pada setiap tahap proses pembekuan dalam ketiga bahan pengencer yang digunakan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan maltosa ke dalam pengencer Andromed® memberikan pengaruh yang baik terhadap persentase spermatozoa motil dan hidup spermatozoa epididimis kerbau belang setelah thawing. Hal tersebut dapat dijadikan sebagai indikator bahwa maltosa sebagai salah satu jenis gula, efektif dalam melindungi

spermatozoa asal epididimis kerbau belang pada proses pembekuan.

Pada proses pembekuan, membran plasma spermatozoa sangat rentan mengalami kerusakan akibat perubahan suhu secara drastis atau cekaman dingin (cold-shock). Untuk itu ke dalam bahan pengencer perlu ditambahkan zat krioprotektan yang dapat melindungi membran plasma sel. Andromed® mengandung gliserol sebagai krioprotektan intraseluler. Pemberian gula maltosa yang ditambahkan ke dalam Andromed® dapat digunakan oleh sel sebagai sumber energi dan sekaligus sebagai krioprotektan ekstraseluler. Gula akan dimetabolisir melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam trikarboksilat (siklus Krebs), sehingga dihasilkan energi berupa adenosine triphosphate (ATP) yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam pergerakan (motilitas). Sementara itu, sebagai krioprotektan ekstraseluler, gula melindungi membran plasma sel sperma dari kerusakan secara mekanik yang mungkin terjadi saat proses kriopreservasi semen. Hal tersebut ditandai dengan lebih tingginya nilai persentase motilitas dan hidup post thawing pada perlakuan penambahan gula maltosa dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (glass) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel sperma secara mekanik (Salamon dan Maxwell, 2000).

Pada penelitian lain yang melakukan penambahan berbagai jenis gula pada semen anjing menunjukkan bahwa kehadiran gula sebagai krioprotektan ekstraseluler dapat meningkatkan kualitas spermatozoa setelah ekuilibrisasi dan thawing (Yldz *et al.*, 2000). Begitu juga pada penelitian Rizal *et al.* (2006) yang melakukan penambahan beberapa jenis gula ke dalam bahan pengencer semen domba Garut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan maltosa dengan dosis 0,2 dan 0,4 % ke dalam media Andromed® dapat mempertahankan viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang setelah thawing.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh dana DIPA BIOTROP 2008. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dinas Peternakan Kabupaten Tana Toraja, Keluarga dr. Yulius dan Bapak Slamet Sumitro yang telah membantu dalam penyediaan peralatan laboratorium, pengadaan dan pengambilan sampel epididimis kerbau belang.

DAFTAR PUSTAKA

- Aku, A.S. 2005. Preservasi dan kriopreservasi semen domba Garut (*Ovis aries*) dalam berbagai jenis pengencer berbasis lesitin. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2000. Reproduction in farm animals. 7th Ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Herold F. C., J. E. Aurich, and D. Gerber. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromedâ and Triladylâ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-724.
- Herold F. C., K. de Haas, B. Colenbrander and D. Gerber. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladylâ or Andromedâ. *Theriogenology* 66: 1123-1130.
- Hori, T., M. Ichikawa, E. Kawakami and T. Tsutsui. 2004. Artificial insemination with frozen epididymal sperm beagle dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 66(1): 37-41.
- Minitub. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfull und Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.
- Revell, S. G. and R. A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- Rizal, M., Herdis, A. Boediono, A. S. Aku dan Yulnawati. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *J. Ilmu Ternak & Veteriner* 11(2): 123-130.
- Rizal, M. 2006. Fertilitas semen beku hasil ejakulasi dan spermatozoa beku asal cauda epididimis domba Garut. *J. Sains Veteriner* 24:49-57.
- Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.

- Sankai, T., H. Tsuchia, and N. Ogonuki. 2001. Short term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 55 (8): 1759-1768.
- Setiadi, M. A., A. Suprayogi, Yulnawati. 2006. Viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa epididimis anjing selama penyimpanan pada pengencer yang berbeda. *J. Media Kedokteran Hewan* 22(2): 118-123.
- Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika (diterjemahkan oleh: B. Sumantri). Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung
- Tsutsui, T., M. Wada, M. Anzai, and T. Hori. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci*, 65 (3): 397-399.
- Yldz, C., A. Kaya, M. Aksoy and T. Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54(4): 579-585.
- Yulnawati dan M. A. Setiadi. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *J. Media Kedokteran Hewan* 21(3): 100-104.