

**PENGARUH MEDIUM PEMISAH, PENAMBAHAN EKSTRAK KOPI SEBELUM
PROSES PEMISAHAN SPERMATOZOA PEMBAWA KROMOSOM X DAN Y
DAN LAMA PENYIMPANAN TERHADAP KUALITAS
SEMEN CAIR KAMBING PERANAKAN ETTAWA**

**(Effect of Separation Medium, Addition of Coffee Extract Before Sexing X and Y
Sperm Chromosome and Storage Period on Quality of
Fresh Semen of Ettawa Cross Goat)**

Hasbi¹, H. Sonjaya¹, dan S. Gustina²

- 1) Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin
- 2) Mahasiswa Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin
Jalan Perintis Kemerdekaan Km. 10 Tamalanrea, Makassar 90245
Corresponding email: hasbi_fapetunhas@yahoo.com

ABSTRACT

One problem in the application of biotechnology in spermatozoa sexing of X and Y sperm chromosome is a decrease in motility and percentage of live spermatozoa. The decrease could be caused by metabolic process, therefore spare energy obtained from separation medium is decreasing resulting in decrease in motility and percentage of live spermatozoa. Research was carried out to evaluate the effects of separation medium, addition of coffee extract before sexing of X and Y sperm chromosome, and storage period on the quality of goat fresh semen. This experiment was performed according to completely randomized design in factorial pattern (2 x 2 x 6). The first factor was the separation medium (A₁: 10% and A₂: 30%), the second factor was the coffee extract addition (B₁: 0 mM and B₂: 3 mM), and the third factor was the period of storage (D₁: 0 hour, D₂: 2 hours, D₃: 4 hours, D₄: 6 hours, D₅: 8 hours and D₆: 10 hours). The result showed that the motility of spermatozoa Y in 30% separation medium was higher (P<0.01) than that of spermatozoa X in 10% separation medium and it was higher (P<0.05) with addition of coffee extract compared with no coffee extract addition. Viability of spermatozoa Y was higher (P<0.05) compared with spermatozoa X and addition of coffee extract not significantly different (P>0.05) compared with no coffee extract addition. The motility and viability of spermatozoa decreased during 10 hours storage. It was concluded that the motility and viability of spermatozoa Y was higher than spermatozoa X. Coffee extract can prevent a decrease of spermatozoa motility during storage. The motility of spermatozoa and the percentage of live spermatozoa decreased during storage.

Key words: Separation medium, Coffee extract, Storage period, Fresh semen, Ettawa cross goat

ABSTRAK

Penerapan bioteknologi pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y seringkali mengalami kendala berupa penurunan motilitas dan persentase hidup. Penurunan motilitas dan persentase hidup dapat disebabkan oleh proses metabolisme, sehingga persediaan energi yang diperoleh dari penambahan larutan pengencer

semakin lama semakin berkurang yang mengakibatkan motilitas dan persentase hidup spermatozoa semakin lama akan semakin menurun. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh medium pemisah, penambahan ekstrak kopi sebelum proses pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y, dan lama penyimpanan terhadap kualitas semen cair kambing peranakan etawa (PE). Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial ($2 \times 2 \times 6$). Faktor A adalah medium pemisah (A_1 : 10% dan A_2 : 30%), faktor B adalah penambahan ekstrak kopi (B_1 : 0 mM dan B_2 : 3 mM), faktor C adalah lama penyimpanan (D_1 : 0 jam, D_2 : 2 jam, D_3 : 4 jam, D_4 : 6 jam, D_5 : 8 jam dan D_6 : 10 jam). Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa pembawa kromosom Y (medium pemisah 30%) sangat nyata lebih tinggi ($P < 0,01$) dibandingkan dengan spermatozoa pembawa kromosom X (medium pemisah 10%) dan penambahan ekstrak kopi nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan tanpa penambahan. Persentase hidup spermatozoa pembawa kromosom Y nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan spermatozoa pembawa kromosom X dan penambahan ekstrak kopi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan tanpa penambahan. Motilitas dan persentase hidup spermatozoa menurun selama 10 jam penyimpanan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah motilitas dan persentase hidup spermatozoa pembawa kromosom Y lebih tinggi dibanding spermatozoa pembawa kromosom X. Penambahan ekstrak kopi dapat mengurangi laju penurunan motilitas spermatozoa selama penyimpanan. Motilitas dan persentase hidup spermatozoa menurun selama penyimpanan.

Kata kunci: Medium pemisah, Ekstrak kopi, Lama penyimpanan, Semen segar, Kambing PE

PENDAHULUAN

Penerapan bioteknologi pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y merupakan salah satu alternatif yang dapat ditempuh untuk dapat memprediksi jenis kelamin anak yang dilahirkan dan dapat disesuaikan dengan permintaan pasar. Pemisahan ini dilakukan karena diketahui bahwa spermatozoa yang dihasilkan oleh pejantan mempunyai dua kromosom seks yang berbeda yaitu X dan Y yang menentukan jenis kelamin anak yang dihasilkan. Spermatozoa pembawa kromosom X dan Y mempunyai perbedaan dalam hal besar, berat, pergerakan, muatan permukaan dan kandungan biokimia spermatozoa. Atas dasar perbedaan tersebut dapat dilakukan pemisahan dengan berbagai macam metode, antara lain metode sedimentasi, imunologi, elektroforesis dan metode filtrasi (Saili dkk., 1998). Susilawati dkk. (2002) melaporkan bahwa pemisahan spermatozoa sapi pembawa kromosom X dan Y dapat dilakukan dengan metode kolom albumen. Lebih lanjut Saili (1999) melaporkan bahwa penggunaan bahan *Bovine Serum Albumen* (BSA) sebagai media pemisah dapat diganti dengan menggunakan putih telur. Penggunaan putih telur sebagai medium pemisah akan lebih mudah diperoleh dan juga lebih murah dibandingkan dengan menggunakan metode-metode yang lain.

Penerapan bioteknologi ini seringkali mengalami kendala yaitu penurunan kualitas setelah pemisahan akibat terjadinya proses metabolisme, sehingga banyaknya energi yang digunakan untuk bergerak menyebabkan motilitas akan menurun dan kemungkinan terjadinya sifat-sifat fisiologis spermatozoa (Sonjaya dkk., 2005). Lebih

lanjut Bearden dan Fuquay (1984) mengemukakan bahwa dengan adanya proses metabolisme secara terus menerus akan menyebabkan penimbunan asam laktat yang selanjutnya akan menurunkan pH dan akibatnya motilitas spermatozoa akan menurun. Selain itu, penambahan pengencer dalam jumlah yang besar selama proses pemisahan juga dapat berakibat negatif terhadap motilitas dan persentase hidup spermatozoa (de Graaf *dkk.*, 2009). Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan penambahan zat tertentu yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa, diantaranya adalah kafein. Kafein (1,3,7 Trimetyl 2,6 Dioksinpurin) mampu meningkatkan motilitas pada spermatozoa yang tidak motil seperti yang terdapat pada testes dengan cara menghambat siklus *nukleotida fosfodiesterase* dan mempengaruhi level intraseluler dari siklus AMP (El Gaafary *dkk.*, 1990). Penambahan kafein pada semen kelinci yang disimpan selama 96 jam pada konsentrasi 0,2 mM/L dapat meningkatkan motilitas spermatozoa (Lopez dan Alvarino, 2000). Lebih lanjut Garbers *dkk.* (1971) melaporkan bahwa peningkatan motilitas spermatozoa sapi dengan pemberian kafein, berhubungan erat dengan peningkatan kadar cAMP.

Pada penelitian ini akan dicoba dilakukan penambahan ekstrak kopi dalam bahan pengencer sebelum dilakukan pemisahan. Bubuk kopi Arabica mengandung 1-1,5% atau 0,01-0,015 gram kafein/gram bubuk kopi kering, sedangkan bubuk kopi Robusta mengandung 2-2,5% atau 0,025 gram kafein/gram bubuk kopi (Shadily, 1997). Penelitian sebelumnya pada kambing Boer, memperlihatkan bahwa penambahan ekstrak kopi dengan dosis 1,5–3,0 mM dapat mengurangi penurunan motilitas spermatozoa hasil pemisahan kromosom X dan Y (Hudiyanti, 2005). Namun demikian, penambahan ekstrak kopi sebelum proses pemisahan belum diketahui pengaruhnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh medium pemisah, penambahan ekstrak kopi sebelum proses pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y, dan lama penyimpanan terhadap kualitas semen cair kambing PE.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian

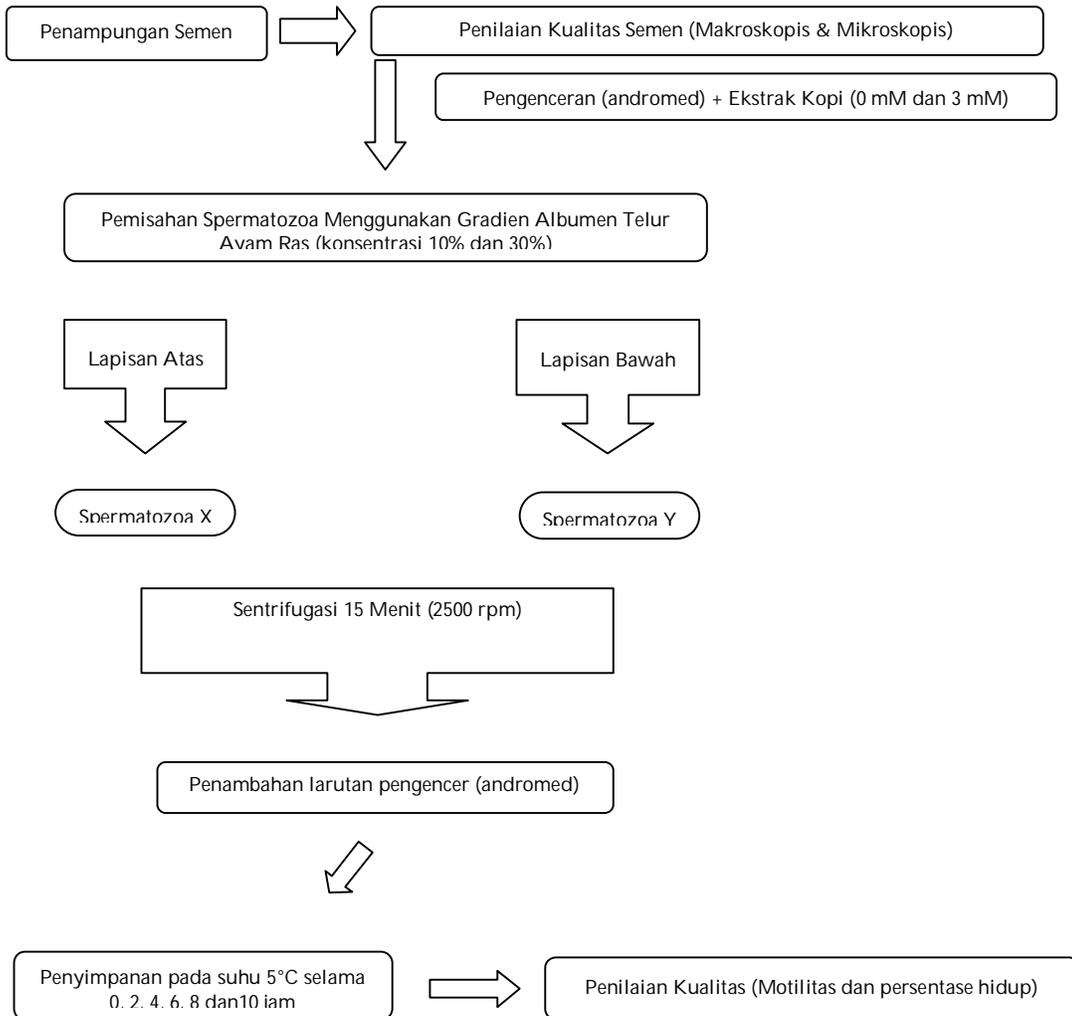
Materi yang digunakan adalah semen cair kambing jantan PE umur 1,5 tahun yang ditampung dengan menggunakan metode vagina buatan. Bahan pengencer yang digunakan adalah andromed (*aquabides*, *fruktosa*, *gliserol*, *acidum citricum*, *buffer*, *fosfolipid*, *spectimocin* 30 mg, *lincumicin* 15 mg, *tilosin* 5 mg, dan *gentamicin* 25 mg) dengan perlakuan penambahan ekstrak kopi dengan konsentrasi 0 mM dan 3 mM.

Metode penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial (2 x 2 x 6) dengan 3 kali ulangan (Gaspersz, 1991). Faktor A adalah medium pemisah (10% dan 30%), faktor B adalah penambahan ekstrak kopi (0 dan 3 mM), faktor C adalah interval waktu penyimpanan (0, 2, 4, 6, 8 dan 10 jam). Faktor C merupakan pengukuran berulang.

Prosedur penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar berikut.



Gambar 1. Alur Penelitian

Penilaian motilitas

Semen diteteskan pada *object glass* dan ditutup dengan *deck glass* kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10 kali. Penilaian motilitas spermatozoa mengikuti prosedur Wahjuningsih dkk. (1998).

Perhitungan persentase hidup

Perhitungan persentase hidup spermatozoa menggunakan preparat ulas yang diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10 kali. Prosedur perhitungan mengikuti metode yang dimodifikasi Sonjaya *dkk.* (2005).

Pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y

Pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dilakukan dengan membuat medium albumen telur dengan konsentrasi 30% untuk fraksi bawah dan 10% untuk fraksi atas. Prosedur pemisahan mengikuti metode yang dimodifikasi Sonjaya *dkk.* (2005).

Penilaian makroskopik

Penilaian makroskopik meliputi volume, warna, pH dan konsistensi. Penilaian warna dan konsistensi mengikuti metode Partodihardjo (1992), penilaian pH mengikuti prosedur Soenardjo (1995), dan penilaian volume mengikuti prosedur Devendra dan Burn (1994).

Penilaian mikroskopik

Penilaian mikroskopik meliputi gerakan massa, gerakan individu, persentase hidup dan konsentrasi. Penilaian gerakan massa dan gerakan individu mengikuti prosedur BIB Lembang (1992), penilaian persentase hidup mengikuti prosedur Susilawati *dkk.* (2002) dan penilaian konsentrasi mengikuti prosedur Suyadi *dkk.* (2000).

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan metode sidik ragam menggunakan program SPSS 11,5 *for windows*. Bila perlakuan menunjukkan pengaruh nyata selanjutnya diuji dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar kambing PE

Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh hasil yang terlihat pada Tabel 1. Hasil evaluasi semen segar kambing PE secara makroskopik maupun mikroskopik adalah sangat baik dan layak untuk diproses lebih lanjut.

Motilitas spermatozoa

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa medium pemisah, lama penyimpanan, interaksi antara lama penyimpanan dengan medium pemisah, dan interaksi antara lama penyimpanan dengan level ekstrak kopi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$), sedangkan level ekstrak kopi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa.

Motilitas spermatozoa pada medium pemisah 30% (spermatozoa Y) sangat nyata lebih tinggi ($P < 0,01$) dibandingkan motilitas spermatozoa pada medium pemisah 10%

(spermatozoa X) ($45,82 \pm 1,07\%$ vs $38,03 \pm 1,07\%$). Tingginya motilitas spermatozoa Y, kemungkinan disebabkan karena spermatozoa Y mempunyai massa dan ukuran yang lebih kecil sehingga pergerakannya lebih cepat serta mampu menembus medium pemisah yang konsentrasinya lebih pekat (30%). Hal ini didukung oleh Jaswandi (1992) bahwa massa dan ukuran spermatozoa Y yang lebih kecil dari spermatozoa X, menyebabkan spermatozoa Y mampu bergerak lebih cepat atau mempunyai daya penetrasi yang lebih tinggi untuk memasuki suatu larutan. Lebih lanjut Tandean dkk. (1980) menjelaskan bahwa spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak di bagian kepala sehingga mengakibatkan ukuran kepala lebih besar dan pergerakannya lebih lambat.

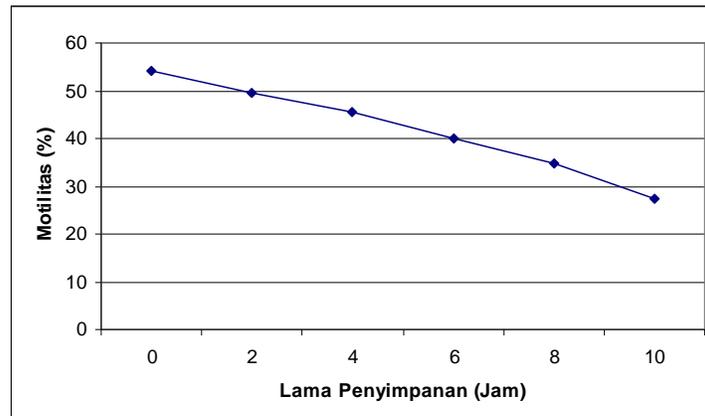
Tabel 1. Karakteristik semen segar kambing PE

Parameter	Nilai	Nilai Pustaka
A. Makroskopis		
- Warna	Krem	Krem (Partodihardjo, 1992)
- Konsistensi	Kental	Kental (Partodihardjo, 1992)
- pH	6,83	6 - 7,08 (Soenardjo, 1995)
- Volume (ml)	0,5	0,5 -1,0 (Devendra dan Burn, 1994)
B. Mikroskopis		
- Motilitas (%)	$78,33 \pm 4,99$	70 -90 (BIB Lembang, 1992)
- Gerakan Massa	3+	> 3 (BIB Lembang, 1992)
- Persentase Hidup (%)	$81,09 \pm 0,77$	60 - 80 (Susilawati dkk., 2002)
- Konsentrasi (juta/ml)	$4646,70 \pm 115,82$	3000 – 6000 (Suyadi dkk., 2000)

Penambahan ekstrak kopi nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibanding tanpa penambahan ($43,78 \pm 1,07\%$ vs $40,07 \pm 1,07\%$) terhadap motilitas spermatozoa. Hal ini mungkin disebabkan oleh kandungan kafein yang terdapat dalam ekstrak kopi yang ditambahkan dalam larutan pengencer yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Lopez dan Alvarino (2000) melaporkan bahwa penambahan kafein dengan konsentrasi 0-5 mM dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, sementara konsentrasi yang lebih tinggi akan menurunkan motilitas. Kafein diduga dapat menghambat siklus *nukleotida fosfodiesterase* yang bertanggungjawab terhadap penurunan cAMP, sehingga konsentrasi cAMP intraseluler dapat meningkat. Dengan meningkatnya konsentrasi cAMP, energi yang dihasilkan lebih banyak sehingga penurunan motilitas spermatozoa setelah proses pemisahan dapat dikurangi. Hal ini didukung oleh pendapat El Gaafary dkk. (1990) bahwa kafein mampu meningkatkan motilitas pada spermatozoa yang tidak motil seperti yang terdapat pada testes, dimana kafein dapat menghambat siklus *nukleotida fosfodiesterase*. Lebih lanjut dikemukakan bahwa kafein dapat mempengaruhi level intraseluler dari siklus AMP yang terlibat dalam motilitas spermatozoa pejantan yang diobservasi.

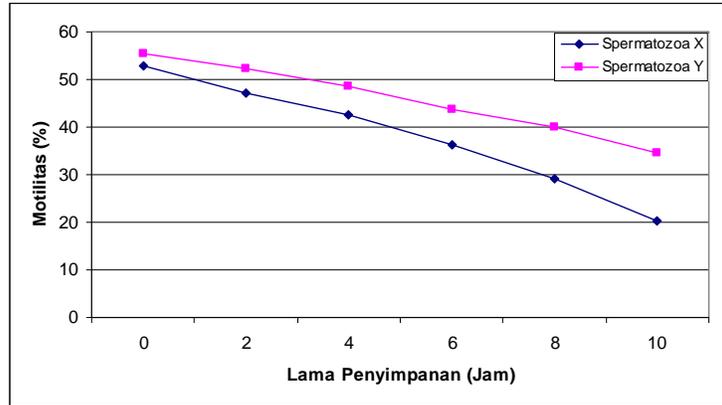
Lama penyimpanan menunjukkan pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa. Semakin lama penyimpanan maka motilitas spermatozoa semakin menurun, mulai dari 54,14% sampai 27,43% (Gambar 2). Motilitas spermatozoa selama 10 jam penyimpanan mengalami penurunan secara linear. Penurunan tertinggi terjadi pada penyimpanan antara 8 dan 10 jam. Hal ini terlihat dari selisih rata-rata penurunan motilitas selama penyimpanan, dimana selisih tertinggi terjadi pada penyimpanan selama 8 dan 10 jam (7,22%). Penurunan motilitas spermatozoa selama

proses pemisahan, kemungkinan dipengaruhi oleh proses metabolisme yang terus berjalan sehingga persediaan energi semakin berkurang. Hal ini didukung oleh pendapat Susilawati *dkk.* (1999) bahwa selama proses pemisahan berlangsung, suhu lingkungan (38,5°C) akan mempengaruhi jalannya proses metabolisme spermatozoa. Proses metabolisme berjalan dengan cepat sehingga persediaan energi semakin lama semakin berkurang yang mengakibatkan motilitas spermatozoa semakin lama semakin lambat. Selain itu, penyimpanan pada suhu 5°C (lemari es) memungkinkan terpapar oleh konsentrasi oksigen yang tinggi sehingga memungkinkan terjadi peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) seperti *superoxide anions* (O_2^-), *hydroxyl radicals* ($OH\cdot$) dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2). *Reactive oxygen species* adalah radikal bebas yang berasal dari metabolisme oksigen yang dapat mengakibatkan kerusakan membran sel spermatozoa dan berakibat terhadap penurunan motilitas (Thuwanut *dkk.*, 2008). Lebih lanjut Bearden dan Fuquay (1984) mengemukakan bahwa dengan adanya proses metabolisme secara terus menerus akan menyebabkan penimbunan asam laktat yang selanjutnya akan menurunkan pH dan sebagai akibatnya motilitas spermatozoa akan menurun.



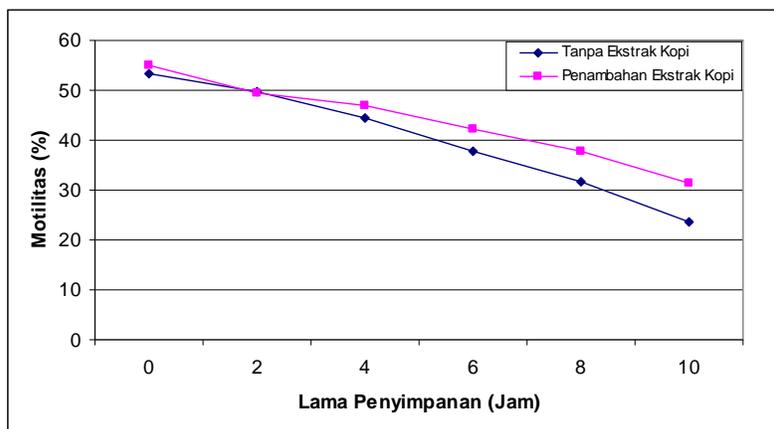
Gambar 2. Pengaruh lama penyimpanan terhadap motilitas spermatozoa.

Interaksi antara lama penyimpanan dengan medium pemisah menunjukkan pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas (Gambar 3). Laju penurunan motilitas spermatozoa X lebih tinggi dibanding spermatozoa Y. Rata-rata laju penurunan motilitas spermatozoa X dan Y relatif sama mulai 0 sampai 6 jam penyimpanan (5,51% vs 4,20%), tetapi pada 6 sampai 10 jam penyimpanan rata-rata laju penurunan motilitas spermatozoa X lebih cepat dibanding spermatozoa Y (7,99% vs 5,85%). Hal ini menunjukkan bahwa selama penyimpanan 10 jam pada suhu 5°C motilitas spermatozoa Y dapat bertahan lebih lama dibandingkan spermatozoa X (34,61% vs 20,24%). Tingginya motilitas spermatozoa Y mungkin dipengaruhi oleh kandungan albumin yang lebih tinggi pada medium pemisah 30% dibandingkan medium pemisah 10%. Pancahastana (1999) melaporkan bahwa dalam albumen terdapat zat yang disebut *lysozyme* yang merupakan senyawa protein yang mengandung antibiotik yang dapat menghancurkan beberapa bakteri yang dapat membunuh spermatozoa yang telah dipisahkan.



Gambar 3. Interaksi lama penyimpanan dengan medium pemisah terhadap motilitas spermatozoa pembawa kromosom X dan Y.

Interaksi antara lama penyimpanan dengan level ekstrak kopi berpengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa (Gambar 4).



Gambar 4. Interaksi lama penyimpanan dengan level ekstrak kopi terhadap motilitas spermatozoa.

Rata-rata laju penurunan motilitas spermatozoa tanpa penambahan ekstrak kopi dan dengan penambahan ekstrak kopi relatif sama mulai 0 sampai 8 jam penyimpanan (5,42% vs 4,32%), tetapi pada 8 sampai 10 jam penyimpanan rata-rata penurunan motilitas spermatozoa tanpa ekstrak kopi lebih cepat dibanding dengan penambahan ekstrak kopi (8,11% vs 6,31%). Hal ini menunjukkan bahwa kafein yang terkandung dalam ekstrak kopi mempunyai khasiat untuk mengurangi penurunan motilitas spermatozoa dibanding tanpa penambahan ekstrak kopi. Henkel dan Schill (2003) melaporkan bahwa kafein adalah salah satu derivat senyawa *methylxanthin* yang dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Kafein yang terikat pada spermatozoa akan merangsang tingginya kalsium antar sel, pH dan cAMP. Peningkatan cAMP pada membran sel akan diikuti dengan peningkatan metabolisme yang memicu peningkatan

motilitas. Lebih lanjut dijelaskan bahwa secara alamiah kadar cAMP relatif rendah oleh adanya aktivitas *nukleotida fosfodiesterase* sehingga penambahan kafein dapat menekan aktivitas *nukleotida fosfodiesterase* sehingga kadar cAMP meningkat.

Persentase hidup spermatozoa

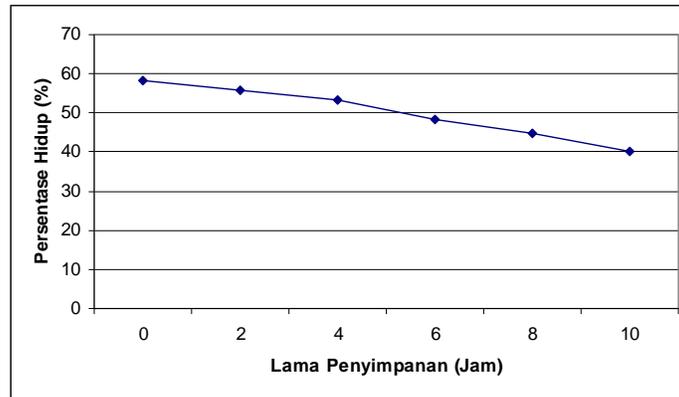
Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa medium pemisah dan interaksi antara lama penyimpanan dengan medium pemisah berpengaruh nyata ($P < 0,05$) dan lama penyimpanan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) sedangkan level ekstrak kopi tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase hidup spermatozoa.

Persentase hidup spermatozoa pembawa kromosom Y lebih tinggi dibanding spermatozoa pembawa kromosom X ($52,41 \pm 0,59\%$ vs $47,81 \pm 0,59\%$). Hal ini mungkin disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi albumen dalam medium pemisah. Medium yang digunakan untuk memisahkan spermatozoa pembawa kromosom Y (30%) mengandung zat *lysozyme* yang lebih tinggi dibandingkan medium yang digunakan untuk memisahkan spermatozoa pembawa kromosom X. Pancastana (1999) melaporkan bahwa dalam albumen terdapat zat yang disebut *lysozyme* yang merupakan senyawa protein yang mengandung antibiotik yang dapat menghancurkan beberapa bakteri yang dapat membunuh spermatozoa yang telah dipisahkan.

Penambahan ekstrak kopi tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase hidup spermatozoa pembawa kromosom Y dan X. Hal ini mengindikasikan bahwa penambahan dan tanpa penambahan ekstrak kopi sebelum proses pemisahan memberikan pengaruh yang relatif sama terhadap persentase hidup spermatozoa 10 jam penyimpanan pada suhu 5°C dalam lemari es ($40,91\%$ vs $39,21\%$). Hal ini mungkin disebabkan karena konsentrasi/level ekstrak kopi yang ditambahkan belum optimal untuk mempertahankan persentase hidup spermatozoa hasil pemisahan.

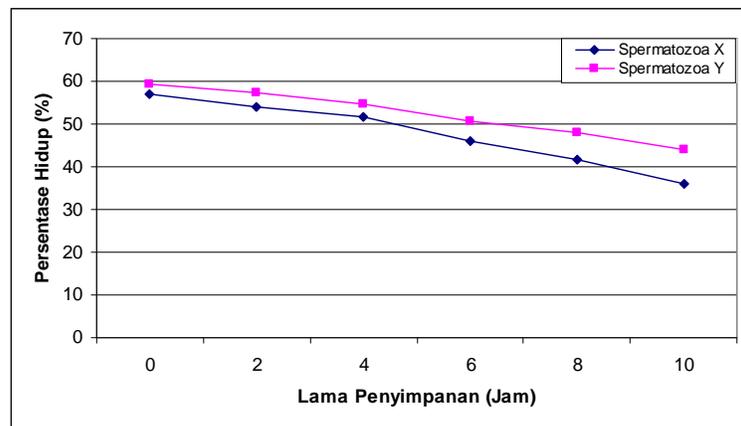
Lama penyimpanan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase hidup spermatozoa. Hal ini mengindikasikan bahwa semakin lama disimpan semakin rendah persentase hidup spermatozoa, mulai dari $58,19\%$ sampai $40,07\%$. Penurunan persentase hidup spermatozoa selama penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 5.

Penurunan persentase hidup spermatozoa selama penyimpanan dipengaruhi oleh ketersediaan energi yang terbatas untuk mempertahankan kondisi fisiologis selama penyimpanan. Hal ini disebabkan karena penyimpanan suhu 5°C proses metabolisme sel spermatozoa tidak terhenti 100%, sehingga energi/nutrisi yang terdapat dalam bahan pengencer yang digunakan habis selama proses penyimpanan. Susilawati *dkk.* (2002) melaporkan bahwa penurunan motilitas dan persentase hidup selama waktu inkubasi (0-5 jam) disebabkan oleh waktu yang semakin lama, sehingga walaupun spermatozoa sudah ditambahkan dengan bahan pengencer, tetapi lama kelamaan fungsi optimal bahan pengencer menurun dan daya gerak spermatozoa juga menurun. Penyimpanan pada suhu 5°C dalam lemari es memungkinkan spermatozoa akan terpapar oleh konsentrasi oksigen yang tinggi, sehingga pembentukan ROS meningkat yang akan berakibat terhadap kerusakan membran sel spermatozoa (Thuwanut *dkk.*, 2008). Kerusakan membran sel spermatozoa tidak hanya berpengaruh terhadap motilitas tetapi juga berpengaruh terhadap persentase hidup.



Gambar 5. Laju penurunan persentase hidup spermatozoa selama penyimpanan

Interaksi antara lama penyimpanan dengan medium pemisah terhadap persentase hidup spermatozoa dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Interaksi lama penyimpanan dengan medium pemisah terhadap persentase hidup spermatozoa pembawa kromosom X dan Y

Laju penurunan persentase hidup spermatozoa X dan Y relatif sama mulai 0 sampai 6 jam penyimpanan, tetapi pada 6 sampai 10 jam penyimpanan penurunan persentase hidup spermatozoa X lebih cepat dibanding spermatozoa Y. Laju penurunan persentase hidup spermatozoa X lebih tinggi dibandingkan spermatozoa Y kemungkinan dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya ketersediaan energi yang terbatas menyebabkan persentase hidup spermatozoa selama penyimpanan mengalami penurunan yang drastis. Isnaini (2002) melaporkan bahwa selama penyimpanan fungsi optimum dari bahan pengencer akan terus menurun sehingga dapat mengakibatkan penurunan motilitas dan persentase hidup spermatozoa. Selain itu mungkin juga disebabkan oleh konsentrasi albumen dalam medium pemisah yang digunakan berbeda sehingga mempengaruhi persentase hidup spermatozoa hasil pemisahan. Pancahastana (1999) melaporkan bahwa dalam albumen terdapat zat yang disebut *lysozyme* yang

merupakan senyawa protein yang mengandung antibiotik yang dapat menghancurkan beberapa bakteri yang dapat membunuh spermatozoa yang telah dipisahkan. Lebih lanjut Susilawati *dkk.* (2002) menjelaskan bahwa dalam albumen terdapat zat yang disebut *lysozyme* yang mengandung antibiotik yang dapat menghancurkan beberapa bakteri dalam hal ini bakteri yang dapat membunuh spermatozoa hasil pemisahan.

KESIMPULAN

1. Motilitas dan persentase hidup spermatozoa pada medium pemisah 30% (spermatozoa pembawa kromosom Y) lebih tinggi dibandingkan pada medium pemisah 10% (spermatozoa pembawa kromosom X).
2. Penambahan ekstrak kopi sebelum proses pemisahan dapat mengurangi laju penurunan motilitas spermatozoa selama penyimpanan.
3. Motilitas dan persentase hidup spermatozoa hasil pemisahan menurun selama penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1984. Applied Animal Reproduction. 2nd ed. Reston Publishing Company. Reston, Virginia.
- BIB Lembang. 1992. Prosedur dan Tatacara Kerja Distribusi Semen Beku. Direktorat Jenderal Peternakan Departemen Pertanian. BIB Lembang, Bandung.
- Devendra, C. dan M. Burns. 1994. Produksi Kambing di Daerah Tropis. ITB dan Universitas Udayana.
- El-Gaafary, M.N., A.D. Daader, and A. Ziedan. 1990. Effects of caffeine on bull semen quality and sperm penetration into cervical mucus. Anim. Reprod. Sci., 23: 13-90.
- Garbers, D.I., N.L. First, J.J. Sullivan, and H.A. Lardy. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. Biol. Reprod., 5: 336-339.
- Gaspersz, V. 1991. Metode Perancangan Percobaan. Armico, Bandung.
- de Graaf, S.P., K.H. Beilby, S.L. Underwood, G. Evans, and W.M.C. Maxwell. 2009. Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. Theriogenology, 71: 89-97.
- Henkel, R. and W.B. Schil. 2003. Sperm preparation for ART. Reprod. Biol. and Endocrinolog, 1: 108-127.
- Hudiyanti, T. 2005. Pengaruh penambahan ekstrak kopi terhadap peningkatan kualitas semen cair kambing Boer hasil sexing spermatozoa X dan Y. Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Isnaini, N. 2002. Pengaruh lama simpan terhadap kualitas semen ayam Arab dalam pengencer ringer's-sari buah pisang pada suhu 4°C. Jurnal Habitat, 8: 258-269.

- Jaswandi. 1992. Pengaruh lapisan suspensi bovine serum albumin 6 dan 10 dalam kolum untuk memisahkan sperma sapi pembawa kromosom X dan Y guna mengubah rasio seks pada pedet. Tesis. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Lopez and Alvarino. 2000. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Animal Science*, 58: 147- 154.
- Pancahastana, H. 1999. Upaya merubah sex rasio spermatozoa dengan melakukan pemisahan spermatozoa X dan Y menggunakan putih telur pada sapi Bali. Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara, Jakarta.
- Saili, T., M.R. Toelihere, A. Boediono, dan B. Tappa. 1998. Pengendalian jenis kelamin anak melalui sexing spermatozoa untuk reproduksi ternak. *Warta Biotek*, 12(1-2): 1-5
- Saili, T. 1999. Efektivitas penggunaan albumen sebagai medium separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada sapi. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Shadily, H. 1997. Ensiklopedi Indonesia. Ictiar baru Van hocvo, Jakarta.
- Soenardjo, C.H. 1995. Teknologi Penampungan, Pemeriksaan, Pengencer dan Penyimpanan serta Evaluasi Semen pada Ternak Kambing dan Domba. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Universitas Jendral Sudirman, Fakultas Peternakan, Purwokerto.
- Sonjaya, H., Hasbi, Sutomo dan Hastuti. 2005. Pengaruh penambahan *calcium ionophore* terhadap kualitas spermatozoa kambing Boer hasil seksing. *J. Sains & Teknologi*, 5(2): 90-101.
- Susilawati, T., B. Sutiman, Sumitro, H.P. Soeharjo, Y. Mantra, dan Nuryadi. 1999. Pola kapasitas spermatozoa X dan Y sapi hasil pemisahan menggunakan filtrasi separadex dan sentrifugasi gradient densitas percoll. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 11: 26-36.
- Susilawati, T., P. Hermanto, E. Srianto, dan Yuliani. 2002. Pemisahan spermatozoa X dan Y pada sapi Brahman menggunakan gradien putih telur pada pengencer tris dan tris kuning telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 14(2): 176-181.
- Suyadi, W. Busono, dan E. Prasetyo. 2000. Pengaruh lama ekuilibrasi terhadap kualitas semen kambing setelah pengenceran. *Habitat*, 11(113): 218-222.
- Tandean, O.S., S.A. Pangkajila, D. Sudjono, A. Hinting, and A. Adimouldjo. 1980. Head size measurement of spermatozoa for the identification of X and Y spermatozoa after filtration through a sephadex gel column. Paper Presented in Lab. of Biomedic. Fac. of Medicine. Airlangga University, Surabaya.
- Thuwanut, P., K. Chatdarong, M. Techakumphu, and E. Axner. 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology*, 70: 233-240.
- Wahjuningsih, S., T. Susilawati, dan G. Ciptadi. 1998. Pengaruh pemberian PMSG dan kombinasi PMSG-HCG terhadap kualitas air mani kambing PE. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 10(2): 52-57.