

PENGARUH SENTRIFUGASI GRADIEN DENSITAS PERCOLL DAN LAMA INKUBASI TERHADAP MORFOMETRI DAN MEMBRAN PLASMA UTAH HASIL SEXING SPERMATOZOA KAMBING PERANAKAN ETAWAH

THE EFFECT OF PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION AND INCUBATION LENGTH ON MORPHOMETRY AND INTACT PLASMA MEMBRANE RESULTS FROM SEXING SPERMATOZOA OF ETAWAH CROSSBREED GOATS

Riska Aprila*, Mas Yedi Sumaryadi dan Aras Prasetyo Nugroho

Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman

Email korespondensi : riska.aprila@mhs.unsoed.ac.id

DOI : <https://doi.org/10.20884/1.angon.2024.6.2.p187-197>

ABSTRAK

Penelitian ini berjudul Pengaruh Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll dan Lama Inkubasi Terhadap Morfometri dan Membran Plasma UtaH Hasil Sexing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah. Tujuan penelitian dilakukan untuk mengkaji interaksi gradien percoll dan lama inkubasi terhadap morfometri dan Membran Plasma UtaH (MPU) hasil separasi seks kambing Peranakan Etawah (PE). Materi yang digunakan untuk penelitian yaitu semen kambing Peranakan Etawah (PE) jantan sebanyak 2 ekor dengan umur 3-4 tahun. Rancangan penelitian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 2 x 3 dengan ulangan frekuensi penyadapan sebanyak 3 kali. Hasil analisis variansi perlakuan yang berpengaruh nyata kemudian dilakukan uji lanjut dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Lokasi penelitian berada di Laboratorium Kesehatan Ternak dan Experimental Farm Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Kabupaten Banyumas, Jawa Tengah. Hasil pengukuran morfometri rata-rata spermatozoa unsexing 30.88 μm^2 , spermatozoa sexing fraksi atas dan fraksi bawah masing-masing 28.44 μm^2 dan 32.63 μm^2 . Hasil dari penelitian keutuhan membran plasma spermatozoa X diperoleh rata-rata sebesar $X_1 = 66.61\%$ dan $X_2 = 68.57\%$ sedangkan spermatozoa Y diperoleh rata-rata sebesar $Y_1 = 64.87\%$ dan $Y_2 = 66.96\%$. Hasil perhitungan statistik dengan uji t-student menunjukkan bahwa spermatozoa fraksi bawah (X) memberikan perbedaan nyata ($P < 0,05$) lebih besar dibanding spermatozoa fraksi atas (Y). Berdasarkan analisis variansi diperoleh hasil tidak ada interaksi antara faktor gradien dan lama inkubasi ($P > 0,05$) terhadap morfometri dan Membran Plasma UtaH (MPU). Faktor gradien berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap morfometri fraksi atas (Y) dan bawah (X), sedangkan faktor gradien dan lama inkubasi masing-masing berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap Membran Plasma UtaH (MPU) fraksi atas (Y) dan bawah (X). Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini yaitu separasi seks menggunakan medium gradien percoll 45:60% dengan lama inkubasi 30 menit mampu memisah dengan baik morfometrik spermatozoa fraksi atas (Y) maupun fraksi bawah (X), bahkan diperoleh persentase membran plasma utuh (MPU) tertinggi baik untuk fraksi atas dan bawah.

Kata kunci : seks separasi, percoll, lama inkubasi, morfometri, MPU, kambing PE

ABSTRACT

This research is entitled The Effect of Percoll Density Gradient Centrifugation (SGDP) and Incubation Length on Morphometry and Intact Plasma Membrane (MPU) Results from Sexing Spermatozoa of Etawah Crossbreed Goats. The aim of the research was to examine the interaction of Percoll gradient and incubation time on the morphometry and Intact Plasma Membrane (MPU) results of sex separation of Etawah Peranakan (PE) goats. The material used for the research was the semen of 2 male Peranakan Etawah (PE) goats aged 3-4 years. The research design was carried out using a Randomized Block Design (RAK) with a 2 x 3 factorial pattern with 3 repetitions of the tapping frequency. The results of the variance analysis of treatments that had a significant effect were then further tested using Duncan's Multiple Range Test (DMRT). The research location is at the Animal Health and Experimental

Farm Laboratory, Faculty of Animal Husbandry, Jenderal Soedirman University, Purwokerto, Banyumas Regency, Central Java. The average morphometric measurement results for unsexed spermatozoa were 30.88 μm^2 , sexed spermatozoa in the upper and lower fractions were 28.44 μm^2 and 32.63 μm^2 , respectively. The results of research on the integrity of the plasma membrane of X spermatozoa obtained an average of X1 = 66.61% and X2 = 68.57%, whereas integrity plasma membrane Y of Y1 = 64,87% and Y2 = 66.96%. The results of statistical calculations using the Student's t-test showed that the lower fraction spermatozoa (X) gave a significantly greater difference ($P < 0.05$) than the upper fraction spermatozoa (Y). Based on analysis of variance, the results showed that there was no interaction between gradient factors and incubation time ($P > 0.05$) on morphometry and Intact Plasma Membrane (MPU). The gradient factor had a significant effect ($P < 0.05$) on the morphometry of the top (Y) and bottom (X) fractions, while the gradient factor and incubation time each had a significant effect ($P < 0.05$) on the Intact Plasma Membrane (MPU) fraction top (Y) and bottom (X). The conclusion obtained from this research is that sex separation using a 45:60% Percoll gradient medium with an incubation time of 30 minutes was able to separate both upper (Y) and lower (X) fractions of spermatozoa morphometrically, and even obtained the highest percentage of intact plasma membrane (MPU), both for the upper and lower fractions.

Key words: sex separation, percoll, incubation time, morphometry, MPU, PE goat

PENDAHULUAN

Kambing Peranakan Etawah (PE) adalah ternak dwiguna penghasil susu dan daging sehingga disukai peternak Indonesia. Kambing PE adalah salah satu dari tujuh kambing lokal yang telah dikarakterisasi secara genetik untuk membuka peluang potensi sumber peningkatan kualitas genetik ternak kambing di Indonesia (Jarmuji *et al.*, 2018). Menurut Alhuur *et al.* (2022) peningkatan kebutuhan kambing dengan melakukan impor menyebabkan masalah baru karena harganya mahal. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk memaksimalkan produktivitas dan peningkatan mutu genetik dibutuhkan teknologi yaitu Inseminasi Buatan (IB). Dampak yang dihasilkan dari penggunaan teknologi IB juga sangat baik, terutama dari sisi efisiensi biaya, karena dengan penerapan teknologi IB, peternak khususnya ternak perah tidak perlu lagi memelihara banyak pejantan di peternakan, teknologi IB juga dapat meningkatkan perbaikan mutu genetik ternak. Pelaksanaan kegiatan peternakan muncul beberapa permasalahan baru diantaranya preferensi peternak mengenai jenis kelamin yang dihasilkan oleh induk. Preferensi yang muncul dari peternak merupakan tantangan baru sehingga dibutuhkan terobosan teknologi untuk menghasilkan keturunan sesuai dengan kebutuhan peternak yaitu separasi seks. Upaya tersebut dilakukan untuk meningkatkan produktivitas ternak dengan memanfaatkan teknologi reproduksi yang memungkinkan pengaturan proporsi normal (rasio alamiah) jantan dengan betina.

Sentrifugasi Gradient Densitas Percoll (SGDP) merupakan salah satu teknik atau metode yang umum digunakan dalam pemisahan spermatozoa berdasarkan perbedaan ukuran antara spermatozoa X dan Y (Susilawati *et al.*, 2017). Proses pemisahan dilakukan menggunakan perbandingan konsentrasi percoll yang berbeda yaitu 40:55 dan 45:60 berdasarkan hasil penelitian Fatahillah *et al.* (2016) yang telah dimodifikasi. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C melalui modifikasi penelitian Anwar *et al.* (2019) dengan tiga lama inkubasi berbeda yaitu 30, 45, dan 60 menit. Sentrifugasi menggunakan perlakuan 2.250 rpm selama 5 menit sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Ama *et al.* (2017) bahwa perlakuan tersebut memperoleh hasil optimal dengan proporsi spermatozoa X dan Y paling tinggi dan tingkat motilitas progresif baik.

Prinsip morfometrik spermatozoa X dan Y yaitu berdasarkan temuan bahwa spermatozoa X memiliki ukuran lebih besar dibanding spermatozoa Y. Berdasarkan analisis ukuran-ukuran sperma memungkinkan identifikasi sperma X dan Y sehingga dapat diketahui proporsi kedua

jenis sperma tersebut (Solihati *et al.*, 2017). Membran plasma berfungsi sebagai pelindung spermatozoa yang sangat penting dalam proses pembuahan. Membran plasma spermatozoa dengan integritas baik dapat mempertahankan cairan osmolalitas dalam sel, sehingga ekor terlihat melingkar atau membengkok. Spermatozoa yang telah mengalami kerusakan dicirikan dengan ekor yang lurus karena tidak mampu menahan cairan yang masuk ke dalam sel (Arsiwan *et al.*, 2014).

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Materi yang digunakan untuk penelitian yaitu semen kambing Peranakan Etawah (PE) jantan sebanyak 2 ekor dengan umur 3-4 tahun. Bahan yang digunakan meliputi medium percoll, NaCl fisiologis sebagai pengencer, larutan HOST, dan vaselin. Alat yang digunakan yaitu artificial vagina/vagina buatan, termos, waterbath, mikroskop, centrifuge, tabung centrifuge, tabung eppendorf, cover glass, object glass, mikropipet, pipet, glass beaker, spuit, kertas label, stopwach.

Rancangan penelitian akan dilakukan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 2 x 3 dengan ulangan frekuensi penyadapan sebanyak 3 kali dan terdiri dari 2 faktor yaitu faktor gradien (G) dan faktor lama inkubasi (T).

Teknik Pengukuran

Morfometri

Penghitungan morfometri dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut (Solihati *et al.*, 2017) :

$$LKS = (0,8988 \times P \times L) - 1,63$$

Keterangan :

LKS : Luas Kepala Spermatozoa

0,8988 : faktor koreksi yang dibangkitkan dari data yang ada dengan menerapkan metode integral untuk menentukan luas kepala spermatozoa dari setiap satuan ukuran dan metode regresi untuk menentukan hubungan ukuran panjang dan lebar dengan luas kepala spermatozoa

P : Panjang kepala spermatozoa

L : Lebar kepala spermatozoa

1,63 : Nilai konstanta regresi

Membran Plasma Utuh (MPU)

Persentase MPU spermatozoa ditentukan dengan metode Osmotic Hypoosmotic Swelling Test (HOST) melalui penghitungan persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh. Penghitungan MPU dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Hardyastuti *et al.*, 2023) :

$$\text{Persentase MPU} = \frac{\text{Jumlah sperma dengan membran plasma utuh}}{\text{Total sperma}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis variansi (ANOVA) dan dilanjutkan uji lanjut dengan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT). Untuk mengetahui perbedaan fraksi atas dan fraksi bawah dilakukan uji t-student tidak berpasangan (un-equal).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Awal Spermatozoa Segar secara Makroskopis dan Mikroskopis

Hasil pemeriksaan awal spermatozoa secara makroskopis dan mikroskopis tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Pemeriksaan Awal Spermatozoa secara Makroskopis dan Mikroskopis

No	Karakteristik	Hasil
1	Volume (ml)	1,25 ± 0,5
2	Warna	Putih kekuningan
3	Konsistensi	Kental
4	pH	7,00 ± 0,00
5	Aroma	Khas
6	Motilitas (%)	84,73 ± 0,72
7	Morfometri (µm ²)	30,83 ± 4,9
8	Viabilitas (%)	87,92 ± 2,18
9	Abnormalitas (%)	5,60 ± 0,36
10	Membran Plasma Utuh (MPU) (%)	76,42 ± 2,83

Hasil pemeriksaan awal spermatozoa berdasarkan Tabel 1 diperoleh bahwa volume semen yang dihasilkan dari kambing PE rata-rata 1,25 ± 0,5 ml. Warna dan konsistensi memiliki korelasi yang positif, apabila warna yang diperoleh pekat maka konsistensi yang dihasilkan kental. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Mokoagow *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa konsistensi, warna dan konsentrasi berkaitan satu sama lainnya. pH hasil penelitian memiliki nilai 7 yang menunjukkan semen netral. Aroma semen yang dihasilkan dalam penelitian normal, yaitu berbau khas.

Motilitas individu sebesar 84,73±0,72% yang diperoleh dalam penelitian menunjukkan nilai baik. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Zaenuri *et al.* (2021) yang menyatakan bahwa berdasarkan Standar Nasional Indonesia (SNI) minimal motilitas individu semen segar untuk diproses lebih lanjut adalah 70%. Hasil yang diperoleh dalam penelitian mendapatkan ukuran luas kepala spermatozoa kambing PE sebesar 30,83 µm². Lailiyah *et al.* (2018) berpendapat bahwa klasifikasi spermatozoa pembawa kromosom X dan Y dapat dilakukan berdasarkan morfometri kepala spermatozoa, yaitu dengan mengukur panjang dan lebarnya. Rata - rata persentase viabilitas dan abnormalitas semen segar adalah 87,92 ± 2,18% dan 5,60 ± 0,36%. Hasil pemeriksaan Membran Plasma Utuh (MPU) yang didapatkan 76,42 ± 2,83%, hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan laporan Ariantie *et al.* (2014) yaitu 78,43±3,88%. Rizal *et al.* (2015) menyatakan bahwa semen segar yang memenuhi syarat untuk diolah dan dimanfaatkan dalam program IB memiliki persentase MPU semen segar 60%, sedangkan yang kurang dari 60% dikategorikan sebagai semen yang infertil.

Morfometri Spermatozoa Kambing PE

Hasil morfometri spermatozoa kambing PE tertera pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfometri Spermatozoa Unsexing dan Sexing

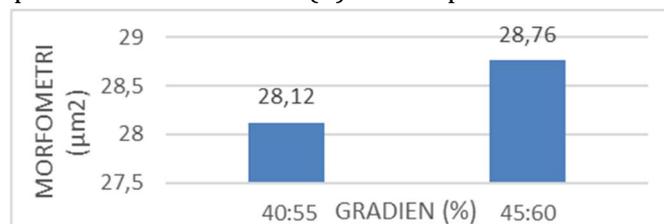
Hasil pengukuran morfometri berdasarkan Gambar 1 diperoleh bahwa spermatozoa pada perlakuan kontrol memiliki ukuran rata-rata 30,83 ± 4,9 µm². Lailiyah *et al.* (2018) menyatakan bahwa ukuran kepala spermatozoa dapat dijadikan acuan untuk mengidentifikasi kromosom penentu jenis kelamin X maupun Y. Selanjutnya dinyatakan bahwa ukuran kepala spermatozoa pada kambing Sapera memiliki luas sebesar rata-rata 29 µm². Perhitungan morfometri setelah separasi seks menunjukkan bahwa rata-rata luas kepala spermatozoa Y yang terdapat pada fraksi

atas sebesar $28.44 \mu\text{m}^2$ lebih kecil dari spermatozoa X pada fraksi bawah yaitu $32,63 \mu\text{m}^2$. Hasil yang diperoleh lebih kecil dari ukuran spermatozoa penelitian yang dilakukan oleh Sudarma *et al.* (2014) dengan ukuran luas kepala $34,45 \mu\text{m}^2$.

Berdasarkan hasil uji t student terhadap morfometri spermatozoa hasil separasi seks pada kambing PE dengan medium Percoll, ternyata spermatozoa pada fraksi bawah (X) memiliki ukuran yang nyata ($P < 0.05$) lebih besar dibandingkan spermatozoa pada fraksi atas (Y). Hal ini sejalan dengan pendapat Sudarma *et al.* (2014) dan Lailiyah *et al.* (2018). Hal tersebut didukung oleh pendapat Dasrul (2013) yang menyatakan bahwa teknik SGDP mampu memisahkan permatozoa berdasarkan jenis kelaminnya.

a. Morfometri Spermatozoa Fraksi Atas (Y)

Hasil morfometri spermatozoa fraksi atas (Y) tertera pada Gambar 2.

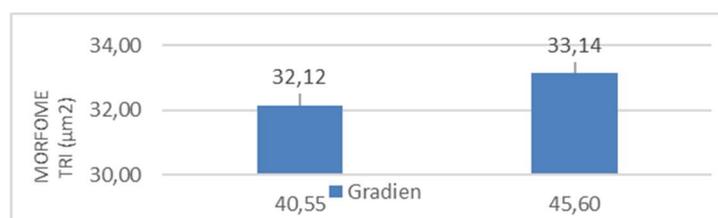


Gambar 2. Hasil Morfometri Spermatozoa Fraksi Atas Berdasarkan Medium Percoll

Hasil pengukuran morfometri fraksi atas memiliki rata-rata $28,44 \pm 0,74 \mu\text{m}^2$ lebih kecil dibandingkan morfometri kambing PE kontrol ($30.83 \mu\text{m}^2$) yang unsexing. Ukuran ini relatif lebih kecil dibandingkan rata-rata spermatozoa fraksi atas pada Kambing Sapera $29 \mu\text{m}^2$ (Lailiyah *et al.*, 2018) maupun pada Babi $34.45 \mu\text{m}^2$ (Sudarma *et al.*, 2014). Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata ($P > 0.05$) antara faktor gradien dan lama inkubasi maupun lama waktu inkubasi ($P > 0.05$) terhadap morfometri fraksi atas. Namun faktor gradien menunjukkan pengaruh hasil yang nyata ($P < 0.05$). Berdasarkan Uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ternyata morfometri spermatozoa g1 ($28,12 \mu\text{m}^2$) nyata ($P < 0.05$) lebih kecil dibandingkan dengan morfometri spermatozoa g2 ($28,76 \mu\text{m}^2$). Ini berarti untuk memperoleh morfometri spermatozoa Y fraksi atas yang lebih kecil maka sebaiknya menggunakan gradien percoll g1 dengan perbandingan 40:55% dengan waktu inkubasi 30 sampai 60 menit.

b. Morfometri Spermatozoa Fraksi Bawah (X)

Hasil morfometri spermatozoa fraksi bawah (X) tertera pada Gambar 3.



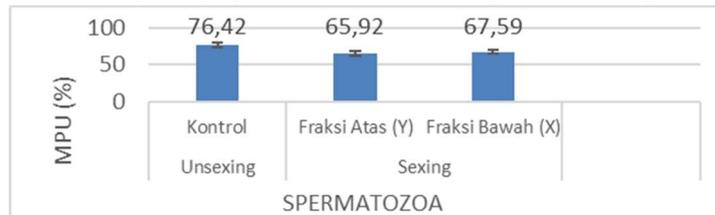
Gambar 3. Hasil Morfometri Spermatozoa Fraksi Bawah

Hasil pengukuran morfometri fraksi bawah memiliki rata-rata $32,63 \pm 0,98 \mu\text{m}^2$ lebih besar dibandingkan morfometri kambing PE kontrol ($30.83 \mu\text{m}^2$) yang unsexing. Ukuran ini relatif lebih besar dibandingkan rata-rata spermatozoa pada Kambing Sapera $29 \mu\text{m}^2$ (Lailiyah *et al.*, 2018) dan lebih kecil dibandingkan pada Babi $34,45 \mu\text{m}^2$ (Sudarma *et al.*, 2014). Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata ($P > 0.05$) antara faktor gradien dan lama inkubasi maupun lama waktu inkubasi ($P > 0.05$) terhadap morfometri fraksi bawah. Namun faktor gradien menunjukkan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$). Berdasarkan Uji lanjut

Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ternyata morfometri spermatozoa g2 (33,14 μm^2) nyata ($P < 0.05$) lebih besar dibandingkan dengan morfometri spermatozoa g1 (32,12 μm^2). Ini berarti untuk memperoleh morfometri spermatozoa X fraksi bawah yang lebih besar maka sebaiknya menggunakan gradien percoll g2 dengan perbandingan 45:60% dengan waktu inkubasi 30 sampai 60 menit.

Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Kambing PE

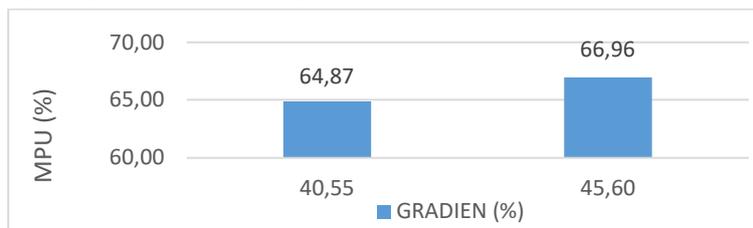
Hasil Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Kambing PE tertera pada Gambar 4.



Gambar 4. Perbandingan MPU Spermatozoa Unsexing dan Setelah Sexing

Berdasarkan Gambar 4 ternyata terjadi penurunan persentase MPU spermatozoa unsexing sebagai kontrol (76,42%) menjadi MPU spermatozoa sexing pada fraksi atas (65,92%) dan fraksi bawah (67,59%) masing-masing sebesar 15,93 dan 13,06%. Diduga penurunan persentase MPU spermatozoa akibat terjadinya proses sexing, karena kerusakan mekanik akibat gesekan antara spermatozoa dengan permukaan alat selama proses sexing. Sesuai dengan pendapat Putri *et al.* (2015) bahwa proses sentrifugasi dalam sexing dapat mengakibatkan fosfolipid pada membran spermatozoa terlepas akibat gaya sentrifugal. Dinyatakan juga oleh Priyanto *et al.* (2022) bahwa penurunan persentase nilai MPU disebabkan oleh paparan zat beracun yang bersumber dari spermatozoa mati maupun dari proses sentrifugasi yang kurang optimal diduga memicu peningkatan Reactive Oxygen Species (ROS) dari sisa hasil metabolisme spermatozoa karena proses sentrifugasi yang belum berjalan baik.

a. Membran Plasma Utuh Fraksi Atas



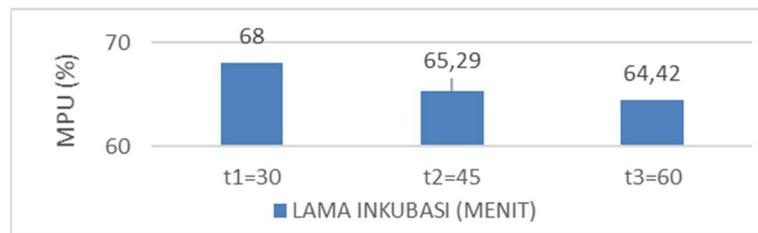
Gambar 5. Gradien MPU Fraksi Atas

Hasil pengamatan MPU fraksi atas memiliki rata-rata $65,92 \pm 1,71\%$ lebih besar dibandingkan rata-rata persentase spermatozoa Y pada sapi Simmental $57,72 \pm 3,2\%$ (Priyanto *et al.* (2022)). Persentase MPU fraksi atas $65,92 \pm 1,71\%$ sudah layak digunakan untuk IB. Hal tersebut sejalan dengan pendapat Yulnawati dan Setiadi (2005) bahwa kualitas semen untuk IB dikatakan layak jika memenuhi standar minimal 40% untuk motilitas progresif dan 60% untuk MPU. Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata ($P > 0.05$) antara faktor gradien dan lama inkubasi. Namun medium gradien dan lama waktu inkubasi masing-masing memiliki pengaruh yang nyata ($P < 0.05$) terhadap MPU fraksi atas.

Berdasarkan Gambar 5 hasil Uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa Membran Plasma Utuh (MPU) pada gradien (g2) 45:60 memiliki persentase spermatozoa (66,96%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan gradien (g1) 45:60 (64,87%). Dengan demikian untuk memperoleh persentase MPU yang tinggi pada fraksi atas (Y) sebaiknya menggunakan medium percoll dengan gradien 45:60%. Ini berarti banyaknya persentase

keutuhan membran plasma pada gradien 45:60 pada fraksi atas menandakan bahwa spermatozoa Y memiliki motilitas yang baik selama proses separasi seks. Semakin tinggi persentase keutuhan membran plasma maka kualitas spermatozoa dapat dikatakan baik. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Thesia (2015) yang menyatakan bahwa daya hidup spermatozoa sangat bergantung pada kondisi membrannya. Semakin baik keutuhan membran plasma spermatozoa maka daya hidup spermatozoa memiliki peluang lebih tinggi.

Uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa fraksi atas (Y) pada lama inkubasi 30 menit t1 (68%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan lama inkubasi t2 (65,29%) dan t3 (64,42%). Adapun MPU spermatozoa pada lama inkubasi t2 dan t3 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0.05$) pada fraksi atas seperti terlihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Lama Inkubasi MPU Fraksi Atas

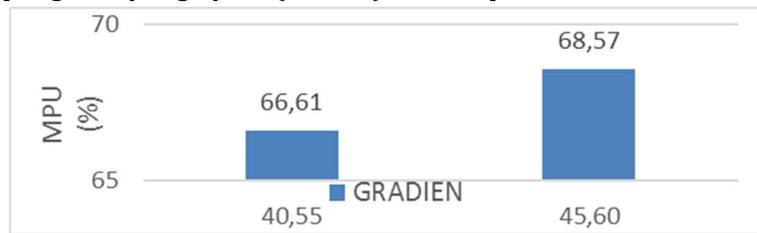
Berdasarkan Gambar 6 penurunan MPU spermatozoa pada perlakuan waktu inkubasi yang lebih lama disebabkan oleh konsumsi energi selama proses metabolisme. Hariono *et al.* (2017) menyatakan bahwa membran plasma berfungsi sebagai pengatur dan pelindung aktivitas organel-organel yang terdapat dalam sel. Penurunan membran plasma secara signifikan seiring dengan penambahan waktu inkubasi ini diduga akibat konsumsi oksigen yang terlalu banyak sehingga terjadi proses peroksidasi lipid selama waktu inkubasi.

Berdasarkan hasil di atas secara keseluruhan menunjukkan bahwa untuk memperoleh persentase MPU spermatozoa yang tinggi pada fraksi atas sebaiknya dilakukan sexing menggunakan medium percoll g2 (45:60) dengan lama waktu inkubasi t1 (30 menit).

b. Membran Plasma Utuh Fraksi Bawah

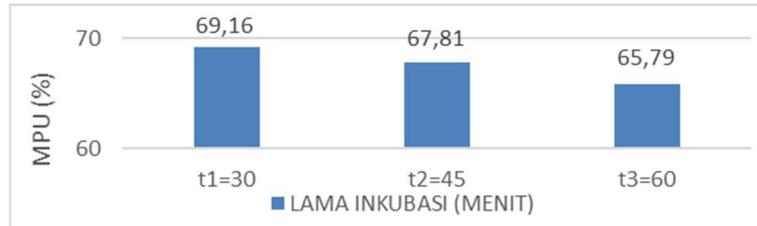
Hasil pengukuran membran plasma utuh (MPU) fraksi bawah memiliki rata-rata $67,59 \pm 1,51$ %. Berdasarkan hasil diketahui bahwa rata-rata persentase membran plasma utuh spermatozoa memiliki angka terendah 61,25% dan tertinggi 70,77%. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang diperoleh oleh Tambing *et al.* (2000) setelah ditambahkan berbagai dosis gliserol sesudah dilakukan pengenceran menunjukkan persentase MPU $72,83 \pm 2,24$ % hingga $73,46 \pm 4,63$ %. Persentase MPU yang diperoleh dalam penelitian dapat digunakan untuk standar IB. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Rizal *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa untuk memenuhi standar IB, semen harus mengandung minimum 40% spermatozoa motil. Perbedaan persentase spermatozoa dalam proses seks separasi dapat terjadi karena rusaknya membran plasma spermatozoa. Perubahan tekanan osmotik pada plasma semen menjadi salah satu faktor yang dapat merusak spermatozoa dengan cara menurunkan permeabilitas membrane sel, sehingga mengganggu fungsi seluler. Dasrul (2013) menyatakan bahwa menurunnya persentasae MPU spermatozoa kambing setelah dilakukan sexing dengan metode SGDP karena pengaruh mekanis yang terjadi saat permukaan membran spermatozoa dengan partikel percoll atau dinding tabung saling bergesekan sehingga menyebabkan perubahan bentuk pada lapisan pelindung di bawah membran sel sperma, yang mengganggu fungsi sel.

Hasil analisis variansi menunjukkan bahwa tidak terjadi interaksi yang nyata ($P>0.05$) antara faktor gradien dan lama inkubasi. Namun medium gradien dan lama waktu inkubasi masing-masing memiliki pengaruh yang nyata ($P<0.05$) terhadap MPU fraksi bawah.



Gambar 7. Gradien MPU Fraksi Bawah

Berdasarkan Gambar 7 hasil Uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ternyata MPU spermatozoa fraksi bawah pada medium percoll 45:60 (g2) yaitu 68,57% sangat nyata lebih tinggi dibandingkan medium percoll (g1) sebesar 66,61%. Ini berarti bahwa untuk memperoleh MPU spermatozoa tertinggi pada fraksi bawah sebaiknya digunakan medium percoll 45:60 (g2). Hal ini sesuai dengan pendapat Arsiwan *et al.* (2014) bahwa perbedaan konsentrasi medium yang digunakan pada spermatozoa dapat mempengaruhi perbedaan persentase membran plasma utuh. Berdasarkan Uji lanjut Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan bahwa MPU spermatozoa fraksi bawah (X) pada lama inkubasi 30 menit t1 (69,16%) nyata ($P<0.05$) lebih tinggi dibandingkan lama inkubasi t3 (65,79%), namun tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan t2 (67,81%). Adapun MPU spermatozoa pada lama inkubasi t2 dan t3 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0.05$) pada fraksi bawah seperti terlihat pada Gambar 8. Ini berarti bahwa untuk memperoleh MPU spermatozoa yang tinggi pada fraksi bawah sebaiknya digunakan lama waktu inkubasi t1 (30 menit).



Gambar 8. Lama Inkubasi MPU Fraksi Bawah

Berdasarkan Gambar 8 terjadi penurunan MPU spermatozoa fraksi bawah sejalan dengan peningkatan lama waktu inkubasi. Hal ini sesuai dengan pendapat Wattimena (2006) menyatakan bahwa penurunan integritas membran plasma seiring bertambahnya waktu inkubasi dipengaruhi oleh faktor umur hidup dan kekuatan membran plasma spermatozoa.

Berdasarkan hasil di atas secara keseluruhan menunjukkan bahwa untuk memperoleh persentase MPU spermatozoa yang tinggi pada fraksi bawah sama halnya seperti fraksi atas sebaiknya dilakukan sexing menggunakan medium percoll g2 (45:60) dengan lama waktu inkubasi t1 (30 menit).

KESIMPULAN DAN SARAN

Morfometrik spermatozoa unsexing lebih besar dibandingkan morfometrik spermatozoa sexing pada fraksi atas (Y) dan lebih kecil dibandingkan dengan morfometrik spermatozoa sexing fraksi bawah. Sexing menggunakan medium gradien percoll 40:55% mampu memisahkan dengan baik morfometrik spermatozoa fraksi atas (Y), sedangkan gradien 45:60% dengan lama inkubasi 30 menit mampu memisahkan dengan baik morfometrik spermatozoa fraksi bawah (X), bahkan diperoleh persentase membran plasma utuh (MPU) tertinggi baik untuk fraksi atas dan bawah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Jenderal Soedirman melalui Lembaga Pengabdian kepada Masyarakat yang telah memberikan anggaran Riset Percepatan Guru Besar melalui dana BLU Universitas Jenderal Soedirman Tahun Anggaran 2023 sesuai dengan Surat Perjanjian kontrak penelitian LPPM Nomor: 27.40/UN23.37/PT.01.03/II/2023. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Kepala Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi, serta Ketua Experimental Farm Fakultas Peternakan atas kerjasamanya dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alhuur, K. R. G, R. Setiawan, dan R. F. Christi. 2022. Penerapan Teknologi Inseminasi Buatan pada Ternak Kambing Perah untuk Percepatan Pemenuhan Kebutuhan Protein Hewani Masyarakat. *Media Kontak Tani Ternak* 4(1) : 21-26.
- Ama, K. T., E. D. Kusumawati, dan A. T. N. Krisnaningsih. 2017. Kualitas Spermatozoa Semen Sexing Kambing Peranakan Etawah (PE) dengan Metode Sedimentasi Putih Telur Menggunakan Pengencer Yang Berbeda. *Jurnal Sains Peternakan* 5 (1) : 39-49.
- Anwar, N. Solihati, dan D. S. D. Rasad. 2019. Pengaruh Medium dan Lama Inkubasi dalam Proses Sexing Sperma Terhadap Kualitas Kambing Semen Kambing Boer. *Jurnal Ilmu Ternak* 19 (1) : 53-61.
- Ariantie, O. S., T. L. Yusuf, D. Sajuthi, dan R. I. Arifiantini. 2014. Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Etawah dalam Modifikasi Pengencer Tris dengan Trehalosa dan Rafinosa. *Jurnal Veteriner* 15 (1): 11-22
- Arsiwan, T. Saili, L. O. Baa, dan S. Rahadi. 2014. Membran Plasma Utuh Spermatozoa Epididimis Kambing Peranakan Etawah dalam Natrium Klorida dengan Konsentrasi Berbeda. *JITRO* 1 (1) : 79 – 87.
- Badan Standardisasi Nasional. 2005. Semen Beku Sapi. BSN. Jakarta.
- Dasrul, M. A. Yaman, dan Zulfan. 2013. Pemisahan Spermatozoa Berkromosom X dan Y Kambing Boer dan Aplikasinya Melalui Inseminasi Buatan Untuk Mendapatkan Jenis Kelamin Anak Sesuai Harapan. *Agripet* 13 (1) : 6-15
- Fatahillah, T. Susilawati, dan N. Isnaini. 2016. Pengaruh Lama Sentrifugasi Terhadap Kualitas dan Proporsi Spermatozoa X-Y Sapi Limousin Hasil Sexing dengan Gradien Densitas Perc oll Menggunakan Pengencer CEP-2+10%KT. *J. Ternak Tropika* 17 (1): 86-97.
- Hardyastuti, D. M., M. Y. Sumaryadi, D. M. Saleh, A. Setyaningrum, dan A. Susanto. 2023. Kualitas Semen Cair dan Semen Beku Kambing Peranakan Etawah (PE) pada Berbagai Jenis Pengencer. *Prosiding Seminar Nasional Pembangunan dan Pendidikan Vokasi Pertanian* 4 (1) : 388 – 396.
- Hariono, M. F. U., E. M. Kaiin, dan N. W. K. Karja. 2017. Karakteristik Spermatozoa Domba yang Diinkubasi Dalam Medium Fertilisasi dengan Waktu dan Konsentrasi Berbeda. *Acta Veterinaria Indonesiana* 10 (3) : 201-210.
- Jarmuji, D. Suherman, E. Silvia dan I. Apriyani. 2018. Peningkatan Produksi Susu dan Income Over Feed Cost (IOFC) Kambing Perah dengan Penambahan Katuk (*Sauropus adrogonus*) dan Kunyit (*Curcuma longa*) pada Sakura Blok. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 13 (3) : 310- 317.
- Kusumawati, E. D., A. T. N. Krisnaningsih, dan Y. P. U. Lele. 2017. Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Semen Sexing Menggunakan Metode Sedimentasi Putih Telur dengan Pengencer yang Berbeda. *Seminar Nasional Hasil Penelitian Universitas Kanjuruhan Malang* 5 (1) 171-177.

- Kusumawati, E. D., K. N. Utomo, A. T. N. Krisnaningsih dan S. Rahadi. 2017. Kualitas Semen Kambing Kacang dengan Lama Simpan yang Berbeda Pada Suhu Ruang Menggunakan Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur. *Jitro* 4 (3) : 42-51.
- Lailiyah, F., P. Sianto, A. L. Saputro, S. P. Madyawati, B. Agustono, dan R. A. Prastiya. 2018. Efektifitas Daya Pisah Electric Separating Sperm (ESS) terhadap Spermatozoa Kromosom X dan Y pada Kambing Sapera. *Jurnal Medik Veteriner* 1 (3) : 93-98.
- Mokoagow, F., E. Pudjihastuti, M.J. Hendrik, dan U. Paputungan. 2021. Makroskopik Semen Segar Kambing Bangsa Peranakan Etawa (PE), Boer dan Saanen di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Zootec* 41 (1) : 150 – 157.
- Nurkholis dan B. Prasetyo. 2014. Minimalisasi Kerusakan Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Akibat Radikal Bebas Selama Periode Cryopreservation dengan Penambahan A Tokoferol dari Ekstrak Limbah Edamame dalam Skim Milk Dilution. *Jurnal Ilmiah Inovasi* 14 (2) 163-170
- Priyanto, L., Putranti, O. D., Riswandi, R., Gunawan, M., Susanda, A., dan Setianingsih, E. 2022. Pengaruh Waktu Sentrifugasi pada Sexing Spermatozoa dengan Media Bovine Serum Albumin Terhadap Membran Plasma Utuh Spermatozoa XY Sapi Simmental. *Cannarium* 20 (2) : 59-62.
- Putri, R. D. A., M. Gunawan, E. Mu. dan Kaiin. 2015. Uji Kualitas Sperma Sexing Sapi Friesian Holstein (FH) Pasca Thawing. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 1 (8): 2057-2061.
- Ramadhan, J. A., M. Riyadhi, N. A. Syarifuddin, A. Wahdi, dan M. Rizal. 2023. Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Yang Dipreservasi Dengan Pengencer Air Tebu. *Agrinimal Jurnal Ilmu Ternak dan Tanaman* 11(1): 45-50.
- Rizal, M., D. Sulistiowati, A. Sulaiman, Herdis, dan I. Sangadji. 2016. Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Kambing Peranakan Ettawa yang Dipreservasi dengan Pengencer Tris dan Berbagai Konsentrasi Maltosa. *Jurnal Sain Veteriner* 34 (1) : 122-129.
- Rizal, M., Herdis, Nasrullah, M. Riyadhi, I. Sangadji, dan Yulnawati. 2015. Kriopreservasi Semen Domba Garut dengan Pengencer Tris yang Disuplementasi Ethylene Diamine Tetraacetic Acid. *Jurnal Veteriner Juni 2015 Vol. 16 No. 2* : 249-255
- Solihati, N., S. D. Rasad, A. Yusrina, dan Y. I. Dimiyati. 2017. Identifikasi Morfometrik Sperma Domba Lokal sebagai Dasar Aplikasi Sexing Sperma. *Jurnal Ilmu Ternak* 17(2):109-113.
- Sudarma, I Made A., W. M. Nalley, L. L. Henderiana, Belli, dan A. Marawali. 2014. Separasi Spermatozoa X dan Y Menggunakan Level Albumin yang Berbeda Sebagai Media Pemisah Spermatozoa Babi. *Jurnal Nukleus Peternakan* 1 (1): 37 – 43.
- Susilawati, T, E. D. Kusumawati, N. Isnaini, A. P. A. Yekti, H. Sudarwati, and A. Ridhowi. 2017. Effect of Sexing Process Using Percoll Density Gradient Centrifugation and Frozen on Motility and Damage to Spermatozoa Membrane of Filial Ongole. *Atlantis Press. Universitas Brawijaya. Malang.*
- Susilawati, T. 2003. Inseminasi Buatan dengan Spermatozoa Beku Hasil Sexing pada Sapi. *Makalah Konggres Persatuan Teknologi Reproduksi Indonesia 2-4 Oktober 2003.*
- Tambing, S. N., M. R. Toelihere, T. L. Yusuf dan I. K. Utama. 2001. Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah setelah Ekuilibrasi. *Hayati* 8:70-75.
- Thesia, L. A. M., N. Solihati, S. Wahyuni H.S. 2015. Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Daya Hidup dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Itik Rambon. *Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran* 1-15.
- Wattimena, J. 2006. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Pola Kapasitasi dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba In Vitro. *JITV* 11(4): 295-301

- Yulnawati dan M. A. Setiadi. 2005. Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kucing Selama Penyimpanan pada Suhu 4°C. *Media Kedokteran Hewan* 21 (3) : 100-104.
- Zaenuri, L. A., Rodiah, A. S. Drajat, dan I W. L. Sumadisa. 2021. Komparasi Biometri Semen dan Morfometri Spermatozoa Kambing Kacang, Peranakan Etawah dan Boer. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia* 7 (1) : 19-28.