

Kajian Bovine Serum Albumin (BSA) dalam Pengencer Caudal Epididymal Plasma -D (CEP-D) Terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin Sebelum dan Sesudah Pembekuan

The Study of Bovine Serum Albumin (BSA) in Caudal Epididymal Plasma-D (CEP-D) Diluent on Limousin Bull Sperm Quality Before and After Freezing

Rafidah Nur Utami*, Nur Ducha, Erlix R. Purnama

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Surabaya

* e-mail: rafidahutami@mhs.unesa.ac.id

ABSTRAK

Rendahnya kualitas sel spermatozoa sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan disebabkan oleh adanya reaksi ROS serta terjadinya cold shock, oleh karena itu, perlu ditambahkan krioprotektan sebagai pelindung sel spermatozoa salah satunya, yaitu Bovine Serum Albumin (BSA) sebagai krioprotektan ekstraseluler. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh penambahan BSA dengan berbagai konsentrasi dalam pengencer CEP-D terhadap motilitas spermatozoa Sapi Limousin. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) yang terdiri atas 6 perlakuan dan 4 pengulangan, yaitu BSA 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; dan 1,25 g/100 ml. Parameter yang diukur adalah persentase motilitas spermatozoa sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan. Data dianalisis menggunakan uji Anava satu arah dan dilanjutkan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan BSA 1 g/100 ml memiliki nilai persentase tertinggi yaitu, persentase motilitas sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan sebesar $61,25\% \pm 1,90$ dan $43,13\% \pm 0,72$. Simpulan penelitian ini adalah penambahan BSA 1 g/100ml dalam pengencer CEP-D dapat mempertahankan motilitas spermatozoa Sapi Limousin sebelum dan sesudah pembekuan.

Kata kunci: BSA ; pengencer CEP-D ; Sapi Limousin ; motilitas spermatozoa.

ABSTRACT

Low quality of sperm sebelum pembekuan and sesudah pembekuan caused of ROS reaction and cold shock, therefore in diluent need cryoprotectant to protection for spermatozoa, which is Bovine Serum Albumin (BSA) as extracellular cryoprotectant. This study aim to know the effect of BSA various concentration in CEP-D diluent on sperm motility of Limousin bull. The research desain was a completely randomized design (RAL) which was composed of 6 treatments and 4 replication, those were BSA 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, and 1.25 g/100 ml. Parameters measured were the motility percentage of Limousin bull sperm before and after freezing. Data were analyzed using one-way ANOVA test and Duncan test. The result showed that BSA 1 g/100 ml had the highest percentage of motility before and after freezing. were $61.25\% \pm 1.90$ and $43.13\% \pm 0.72$. The conclusion of this study was the addition of BSA 1g/100 ml in CEP-D diluent can maintain the motility of Limousin bull sperm before and after freezing.

Key Words: BSA; CEP-D diluent; Limousin bull; sperm motility

PENDAHULUAN

Sel spermatozoa dilakukan penyimpanan untuk dapat digunakan dalam program Inseminasi Buatan (IB). Salah satu teknik penyimpanan yang banyak dilakukan adalah dengan metode pembekuan yang disimpan di dalam nitrogen cair suhu -196°C . Menurut Gazali dan Surya (2001), metode pembekuan dilakukan dengan mereduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi fungsi fisiologi sel spermatozoa sehingga dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama dan tetap bersifat fertil.

Penyimpanan sel spermatozoa dengan metode pembekuan memerlukan pengencer untuk mempertahankan kualitas sel spermatozoa.

Salah satu pengencer yang digunakan untuk semen sapi dan sedang dikembangkan oleh Ducha (2012), adalah CEP-D (Caudal Epididymal Plasma -D) yang memiliki kandungan biokimia hampir sama dengan cauda epididymal plasma sapi dengan penambahan antibiotik dan krioprotektan. Krioprotektan yang terkandung dalam pengencer CEP-D salah satunya yaitu BSA 0,2 g/ml akan tetapi belum memiliki konsentrasi yang tepat sehingga perlu dilakukan pengkajian mengenai penambahan BSA berbagai konsentrasi.

Penambahan BSA dalam pengencer CEP-D sebagai krioprotektan ekstraseluler yang melindungi membran sel spermatozoa selama proses penyimpanan. Menurut Purwoistri, dkk.

2013) mekanisme perlindungan BSA yaitu dengan mengatur transpor ion Ca^{2+} agar tidak terlalu berlebih di dalam sel karena akan menyebabkan penurunan pergerakan progresif sel spermatozoa. Selain itu menurut Perumal *et al.* (2014), BSA sebagai sebagai jalur untuk ion transisi Fe^{2+} dan Cu^{2+} sehingga dapat meminimalkan terjadinya peroksidasi lipid dengan berkurangnya pembentukan OH \cdot . Akhter, *et al.* (2014), telah membuktikan mengenai penambahan BSA pada pengencer tris kuning telur dengan konsentrasi BSA yang digunakan adalah 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 g/100ml dapat mempertahankan kualitas spermatozoa (motilitas, plasmalema, viabilitas dan integritas kromatin) kerbau setelah pembekuan. Penambahan BSA dalam mempertahankan kualitas sel spermatozoa berbeda-beda pada setiap spesies dan pengencer sehingga perlu dilakukan pengkajian penambahan BSA berbagai konsentrasi BSA dalam pengencer CEP-D terhadap kualitas spermatozoa Sapi Limousin sebelum dan sesudah pembekuan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan BSA dengan berbagai konsentrasi dalam pengencer CEP-D terhadap motilitas spermatozoa Sapi Limousin sebelum dan sesudah pembekuan.

BAHAN DAN METODE

Penampungan semen segar dilakukan di Laboratorium *Teaching Farm* Universitas Airlangga, Gresik. Penampungan semen segar Sapi Limousin dilakukan dengan menggunakan metode *Artificial Vagina* (AV) oleh petugas penampung. Semen segar yang digunakan berasal dari pejantan Sapi Limousin umur 4 tahun. Semen segar yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian semen segar secara makroskopis, mikroskopis, dan konsentrasi. Pengujian makroskopis meliputi pH, volume, bau, warna, kekentalan dan konsentrasi. Pengujian mikroskopis meliputi motilitas massa, dan motilitas individu.

Pengujian pH dilakukan dengan meneteskan semen segar pada kertas pH dan dilihat skala pengukuran. Pengujian volume dilihat pada skala tabung semen. Pengujian bau dilakukan dengan mencium secara langsung aroma semen segar. Pengujian warna dilakukan dengan melihat secara langsung warna semen segar dalam tabung semen. Pengujian kekentalan dilakukan dengan memiringkan tabung semen, apabila bergerak lambat selama dimiringkan, maka dikatakan kental. Selain itu semen dikatakan kental apabila dilihat dari konsentrasinya memiliki konsentrasi

spermatozoa $>1500 \times 10^6$ /mL. Pengujian konsentrasi dilakukan dengan alat *spektrofotometer*. Pengujian motilitas massa dilakukan dengan meletakkan semen segar di atas gelas objek tanpa ditutup *cover glass*. Pengujian motilitas individu semen segar dilakukan dengan meletakkan semen segar di atas gelas objek kemudian ditutup *cover glass* dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Metode dan bahan yang digunakan dalam pembuatan pengencer CEP-D menurut Duchá (2012) meliputi NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , fruktosa, sorbitol, *Tris base*, penisilin, streptomisin, asam sitrat dan berbagai konsentrasi BSA. Konsentrasi BSA yang digunakan yaitu 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 g/100mL. Bahan tersebut dihomogenkan secara *aliquot* menggunakan air infus yang kemudian disterilisasi menggunakan membran *miliphore* ukuran 0,22 μm . Pengencer yang telah disterilisasi kemudian dilakukan suplementasi menggunakan kuning telur ayam strain *hisex brown* sebanyak 20%.

Pengenceran semen dilakukan dengan 3 tahap pengenceran yaitu pengenceran A1, A2 dan B. Pengenceran A1 dan A2 dilakukan di suhu 37°C. Pengenceran B dilakukan pada suhu 5°C. Pengenceran A1 dilakukan penambahan pengencer dengan rumus 1:1 (semen : pengencer). Pengenceran A2 dilakukan penambahan pengencer dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Volume A2} = \frac{\text{V. total}}{2} - \Sigma \text{V. semen} + \text{V. A1}$$

Setelah pengenceran A2, pengencer diletakkan di dalam *refrigerator* dengan metode water jacket dan dibiarkan sampai suhu semen dan pengencer 5°C. Setelah itu dilakukan pengenceran B yaitu menambahkan pengencer + 7% gliserol dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Volume B} = \frac{\text{V. total}}{2}$$

Volume total didapatkan dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Volume total} = \frac{\text{V. semen} \times \text{konsentrasi spermatozoa} \times 0,25}{25 \times 10^6}$$

Setelah pengenceran, dilanjutkan dengan pengujian sebelum pembekuan kemudian semen dilakukan *filling* dan *sealing* dalam straw yang sebelumnya sudah dilakukan ekuilibrisasi pada suhu 5°C. Langkah selanjutnya yaitu *pre freezing* diatas uap nitrogen cair dengan jarak 1 cm selama 9 menit. Setelah itu, dilakukan *freezing* dimana straw berisi semen cair diletakkan dalam goblet dan dicelupkan ke dalam nitrogen cair dengan suhu -196°C

Pengamatan motilitas dilakukan dengan mengestimasi pergerakan sel spermatozoa progresif maju ke depan. Pengamatan motilitas dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x dan dilakukan oleh dua orang yang kemudian dihitung nilai rata-ratanya. Pengamatan sesudah pembekuan dilakukan setelah semen dilakukan *freezing* selama 1 x 24 jam kemudian dilakukan *thawing* dalam air hangat suhu 37°C selama 5 detik. Pengamatan motilitas sebelum pembekuan dilakukan dengan meneteskan semen di atas gelas objek menggunakan *stick glass* kemudian ditutup cover dan diamati di bawah mikroskop. Pengamatan sesudah pembekuan dilakukan dengan metode *thawing* dimana straw yang telah dibekukan dimasukkan dalam air hangat suhu 37°C selama 5 detik kemudian dipotong bagian tengah straw menggunakan gunting tetapi tidak sampai patah, setelah itu semen diletakkan di atas gelas objek dan ditutup cover glass dan diamati di bawah mikroskop.

Data motilitas spermatozoa Sapi Limousin diperoleh dianalisis menggunakan uji Anava satu arah untuk mengetahui pengaruh perlakuan penambahan BSA dengan berbagai konsentrasi terhadap motilitas spermatozoa Sapi Limousin sebelum dan sesudah pembekuan. Apabila signifikan dilanjutkan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan pada tiap perlakuan.

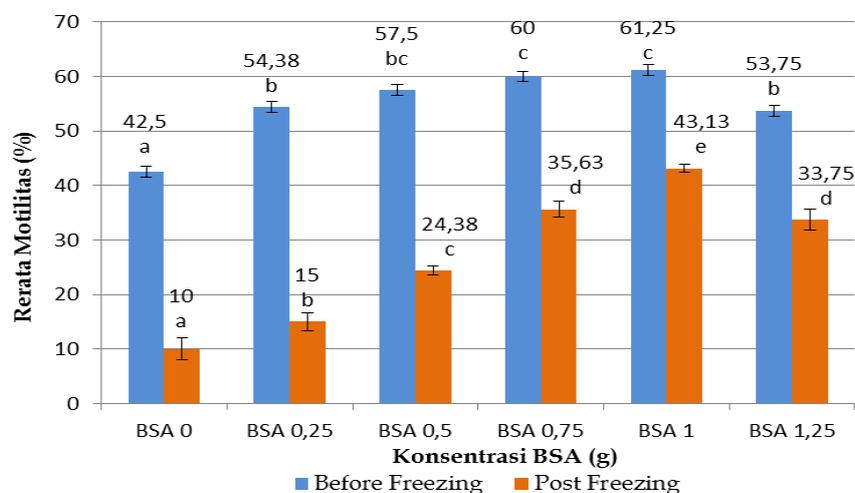
HASIL

Data rerata persentase motilitas spermatozoa Sapi Limousin dalam pengencer CEP-D dengan berbagai macam konsentrasi BSA sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan tersaji pada Gambar 1. Uji Duncan ($\alpha = 0,05$), pengujian motilitas spermatozoa Sapi Limousin sebelum

pembekuan menunjukkan perlakuan BSA 0 berbeda nyata pada semua perlakuan penambahan BSA dengan berbagai konsentrasi. Perlakuan BSA 0,25, BSA 0,5, dan BSA 1,25 tidak berbeda nyata karena memiliki notasi yang sama. Selain itu, perlakuan BSA 0,5, BSA 0,75 dan BSA 1 memiliki notasi yang sama sehingga data yang diperoleh tidak berbeda nyata. Pengujian motilitas spermatozoa sesudah pembekuan menunjukkan pada perlakuan BSA 0, BSA 0,25, BSA 5 dan BSA 1 berbeda nyata pada semua perlakuan, sedangkan perlakuan BSA 0,75 dan BSA 1,25 tidak berbeda nyata. Perlakuan BSA 0 merupakan perlakuan dengan nilai rerata persentase terendah sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan yaitu 42,5% dan 10,00%. Perlakuan BSA 1 merupakan perlakuan dengan nilai persentase motilitas sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan tertinggi yaitu 61,25% dan 43,13%.

PEMBAHASAN

Penurunan kualitas spermatozoa sesudah pembekuan disebabkan karena sel spermatozoa pada proses penyimpanan mengalami penurunan suhu dari suhu tubuh 37°C menjadi 4-5°C pada proses pengenceran dan -196°C pada proses pembekuan di dalam nitrogen cair. Menurut Barrios, *et al.* (2000), penurunan persentase motilitas spermatozoa disebabkan oleh terjadinya *cold shock* yang menyebabkan perubahan struktur protein dan lipid, terutama pada bagian akrosom dan membran plasma sel spermatozoa sehingga perlu ditambahkan krioprotektan untuk melindungi membran sel selama proses penyimpanan. Salah satu krioprotektan yang ditambahkan adalah BSA.



Gambar 1. Grafik persentase motilitas \pm standar deviasi spermatozoa sapi limousin sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan keterangan : Notasi yang berbeda (a,b,c,d,e) pada kolom yang sama menunjukkan bahwa perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata

Rerata persentase motilitas sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan terbaik didapatkan pada perlakuan BSA 1 g/100 ml yaitu 61,25% dan 43,13%. Hasil tersebut juga didapatkan pada penelitian Ashrafi, *et al.* (2013) penambahan BSA 1g/100 ml merupakan dosis terbaik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa Sapi FH dalam pengencer sitrat kuning telur dengan nilai motilitas sesudah pembekuan sebesar 54,77%. Persentase motilitas sesudah pembekuan spermatozoa Sapi Limousin pada perlakuan BSA 1 dapat digunakan untuk IB karena memiliki persentase motilitas > 40% (SNI, 2017). Penambahan BSA sebagai krioprotektan ekstraseluler pada membran plasma sebagai enzim, reseptor, saluran maupun carrier dengan kata lain makromolekul bertugas sebagai pengatur keluar masuknya berbagai zat dalam sel. Menurut Stein dan Standford (1948), BSA memiliki kandungan Amide NH_3 dan keseluruhan jenis asam amino kecuali glutamin dan asparagin sebagai mikronutrien dalam BSA. Selain itu, BSA memiliki kandungan makronutrien berupa albumin yang dapat mempertahankan membran sel secara ekstraseluler. Mekanisme perlindungan BSA menurut Perumal, *et al.* (2014) dan Ducha (2018), dapat meminimalisir pembentukan radikal hidroksil (OH^\cdot) karena adanya transport ion Fe^{2+} dan Cu^{2+} . Menurut Tvrdá, *et al.* (2015), adanya ion Fe^{2+} dan Cu^{2+} dalam perlindungan BSA sebagai komponen penyusun antioksidan endogen superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT) sehingga membran sel akan lebih stabil dalam mempertahankan kualitas spermatozoa. Menurut Purwoistri, dkk. (2013), selain ion Fe^{2+} dan Cu^{2+} , ion Ca^{2+} juga berperan dalam perlindungan BSA agar tidak terlalu berlebih di dalam sel karena akan menyebabkan kapasitas sehingga dapat mempecepat menurunkan pergerakan spermatozoa.

Perlakuan BSA 0 merupakan perlakuan dengan nilai rerata persentase terendah sebelum dan sesudah pembekuan yaitu 42,5% dan 10,00%. Rendahnya nilai rerata persentase tersebut dikarenakan pada perlakuan BSA 0 tidak ditambahkan krioprotektan ekstraseluler berupa BSA sehingga sel diduga mengalami *cold shock* serta mengalami reaksi ROS selama proses penyimpanan. Menurut Rahman, *et al.*, (2015), ROS memiliki elektron tidak berpasangan mempengaruhi sifat fisiologi spermatozoa sehingga perlu diberikan perlindungan berupa pengencer dengan tambahan krioprotektan untuk menjaga kualitas spermatozoa pada saat proses kriopreservasi. Adanya reaksi ROS menyebabkan

sel mengalami peroksidasi lipid berkepanjangan sehingga dapat merusak struktur membran sel spermatozoa dan mengganggu proses metabolisme sel dalam melindungi organel sel dan pengatur transport ion (Wahana, dkk., 2013).

Jenis ion yang dibutuhkan dalam pergerakan sel spermatozoa menurut Asmarina (2010), yaitu ion Na^+ , K^+ dan Ca^{2+} . Aliran ion Na^+ dan Ca^{2+} ke dalam sel spermatozoa dengan diikuti keluarnya ion K^+ dapat mengaktifasi enzim yang berperan dalam pergerakan sel spermatozoa. Menurut Susilawati (2011), ion Ca^{2+} yang dibantu oleh Methylsi phospholipid masuk ke dalam sel merangsang *adenylate cyclase* dan menghasilkan cAMP. Ion Ca^{2+} dan cAMP merupakan pengatur pergerakan sel spermatozoa. Terganggunya pompa ion yang disebabkan oleh rusaknya membran sel akan mengurangi kualitas sel spermatozoa salah satunya yaitu penurunan persentase motilitas.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Penambahan BSA dengan berbagai konsentrasi dalam pengencer CEP-D dapat mempertahankan motilitas spermatozoa Sapi Limousin sebelum dan sesudah pembekuan sesuai standar minimum SNI.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Dr. Drh. Trilas Sardjito, M.Si., Dr. Drh. Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., dan Drh. Kukuh yang telah memberikan bimbingan selama penelitian di Laboratorium Teaching Farm, Universitas Airlangga, Gresik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhter S, Bushra A R, Razia I, dan Muhammad S A, 2014. Effect of Bovine Serum Albumin on Motility, Plasmalemma, Viability and Chromatin Integrity of Buffalo Bull Spermatozoa. *Journal Pakistan J. Zool.* 46(01) : 115-120.
- Ashrafi I, Hamid K, dan Hossein T N, 2013. Antioxidant Effects of Bovine Serum Albumin on Kinetics, Microscopic and Oxidative Characters of Cryopreserved Bull Spermatozoa. *Journal Agricultural Research.* 11(03) : 695-701.
- Asmarina, 2010. Peran Molekul Kanal Ion pada Fungsi Spermatozoa. *Maj kedokteran Indonesia.* 60(08) : 374-81
- Barrios B, Rosaura P-P, Margarita, G Agustin T, Jesus O, Teresa M B, dan Jose A C P, 2000. *Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock*

- Damage on Ram Sperm Membrane. Journal Biology of Reproduction.* 63 : 1531-1537.
- Ducha N, 2012. *Suplementasi Kuning Telur Dalam Pengencer CEP-2 Terhadap Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Suhu 4-5°C.* Disertasi tidak diterbitkan. Malang: Universitas Brawijaya.
- Ducha N, 2018. The Test about Blood Serum Capabilities in Maintaining The Quality of Bull Spermatozoa During Storage in CEP Diluent at Refrigerator Temperature. *Earth and Environmental Science.* 130 : 1-5
- Gazali M, dan Surya N T, 2001. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati.* 9(1) : 27-32.
- Perumal P, Nahak A K, Vupru K, Khate K, Balamurugan T C, dan Prakash Krupakaran R, 2015. Effect of Addition of Bovine Serum Albumin on The Liquid Storage (5°C) of Minthun (*Bos frontalis*) Semen. *Cell and Tissue Research.* 15(01) : 4795-4800.
- Purwoistri R F, Trinil S, dan Sri R, 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan *Cauda Epididymal Plasma-2* Ditambahkan Kuning Telur. *Veteriner.* 14(03) : 371-378
- Rahman Z, M Anwar, Sayed M H A, Abid M, Liaqat A, dan Husain A, 2015. Effect of Bovine Serum Albumin in Extender on Post-Thaw Quality and *In Vitro* Fertility of Buffalo Bull Semen. *Buffalo Buletin.* 34(04) : 417-421
- SNI, 2017. Semen Beku-Bagian 1 : Sapi. Diakses melalui <http://bibit.ditjenpkh.pertanian.go.id/sites/default/files/SNI%204869-1-2017%20Semen%20beku%20-%20Bagian%201%20Sapi.pdf> pada tanggal 17 Desember 2017.
- Stein W H, dan Stanford M, 1948. Amino Acid Composition of β -Lactoglobulin and Bovine Serum Albumin. *Biol Chem* : 79-91
- Susilawati T, 2011. *Spermatology.* Malang : Universitas Brawijaya Press.
- Tvrda E, Rohan P, Suresh C, Sikka, dan Ashok A, 2015. Iron and Copper in Male Reproduction : a Double-Edge Sword. *Assist Reprod Genet.* 32 : 3-16.
- Wahana A G, Made K B, dan Wayan B, 2014. Penambahan Bovine Serum Albumin Mempertahankan Motilitas Progesif Spermatozoa Kalkun pada Penyimpanan Suhu 4°C. *Indonesia Medicus Veterinus.* 3(4) : 317-322.