

Kelahiran Anak Sapi Perah Betina Hasil Inseminasi Buatan Menggunakan Sexed Sperma yang Dipisahkan dengan Kolom Albumin Telur

Situmorang P¹, Sianturi RG¹, Kusumaningrum DA¹, Ross², Maldaswar²

¹Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221 Bogor 16002

E-mail: psitumorang@yahoo.com

²Balai Inseminasi Buatan Lembang, Bandung Jawa Barat

(Diterima 15 Juni 2013 ; disetujui 20 Agustus 2013)

ABSTRACT

Situmorang P, Sianturi RG, Kusumaningrum DA, Maldaswar. 2013. Female calves born resulted from an artificial insemination (AI) using sexed sperm separated with egg albumin column. JITV 18(3): 185-191. DOI: 10.14334/jitv.v18i3.320.

An efforts to alter the sex ratio of calves born could be made by separating spermatozoa bearing X and Y chromosome. The object of this study is to increase the female dairy calves born resulted from artificial insemination using the sexed sperm. There were 2 activities conducted which were 1) Spermatozoa separation based on two egg albumin column with a concentration of 10% as the upper column (UC) and 30% as the lower column (LC) and 2) AI using semen from UC. Experiment designed was completely randomized designed with three separation time (10, 20 and 30 minutes) for the treatments. Semen from UC which is expected rich in spermatozoa X, diluted in Tris Citrate extender to give a final concentration of 100 million sperm/cc and frozen to -196°C for AI purposes. Results showed that separation of semen using egg albumin column, affects the size of head of spermatozoa. The means of length, width and area size of head spermatozoa were 8.7 µm, 4.7 µm, 35.7 µm² and 8.4 µm, 4.6 µm, 33.7 µm² for UC and LC respectively. The livability of sperm from UC and LC were not statistically significant different. The mean percentage of motile (%M), live sperm (%L) and intact apical ridge (%IAR) were 77.8, 85.5, 78.1 and 76.1, 83.5, 78.4 for UC and LC respectively. Separation time did not significantly affect the size of spermatozoa heads of UC semen. The mean length, width and area size of head of spermatozoa were 8.7 µm, 4.5 µm, 36.1 µm²; 8.7 µm, 4.8 µm, 36.2 µm² and 8.5 µm, 4.7 µm, 34.8 µm² for 10; 20 and 30 minutes respectively. From total of 160 calves born showed that the female calves born was 65%. It is concluded that AI using sexed sperm separated with egg albumin could increase the percentage of female calves born.

Key Words: Egg Albumin, Column, Separation Time, Size Sperm, Female Calve

ABSTRAK

Situmorang P, Sianturi RG, Kusumaningrum DA, Maldaswar. 2013. Kelahiran anak sapi perah betina hasil inseminasi buatan menggunakan sexed sperma yang dipisahkan dengan kolom albumin telur. JITV 18(3): 185-191. DOI: 10.14334/jitv.v18i3.320.

Usaha untuk merubah rasio jenis kelamin anak sapi dapat dilakukan dengan pemisahan spermatozoa pembawa kromosom X dan Y. Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan kelahiran anak sapi perah betina menggunakan sexed sperma. Ada dua kegiatan yang dilakukan yaitu 1) Pemisahan spermatozoa berdasarkan dua kolom albumin telur (AT) dengan konsentrasi 10% (KA) dan 30% (KB) dan 2) Inseminasi Buatan (IB) menggunakan semen dari KA. Rancangan penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan 3 perlakuan waktu pemisahan (10,20 dan 30 menit). Spermatozoa dari KA yang kaya akan sperma X, diencerkan 100 juta sperma/ml dan dibekukan -196°C untuk tujuan Inseminasi Buatan (IB). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemisahan sperma dengan kolom AT mempengaruhi ukuran kepala spermatozoa dari kedua kolom AT. Rataan panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa adalah 8,7 µm; 4,7 µm; 35,7 µm² dan 8,4 µm; 4,6 µm; 33,7 µm² untuk berturut-turut spermatozoa KA dan KB. Tidak didapat perbedaan yang nyata secara statistik akan daya hidup sperma antara kedua kolom. Rataan persentase motil (%M), sperma hidup (%H) dan sperma dengan tudung akrosom utuh (%TAU) adalah 77,8; 85,5 dan 78,1 dan 76,1; 83,5 dan 78,4 untuk berturut-turut KA dan KB. Waktu pemisahan tidak nyata secara statistik mempengaruhi ukuran kepala spermatozoa dan daya hidup spermatozoa. Rataan panjang, lebar dan luas spermatozoa dari KA adalah 8,7 µm; 4,5 µm; 36,1 µm² dan 8,7 µm; 4,8 µm; 36,2 µm² dan 8,5 µm; 4,7 µm dan 34,8 µm² untuk berturut-turut waktu pemisahan 10, 20 dan 30 menit. Dari total 160 kelahiran anak hasil IB menggunakan sexed spermatozoa KA menunjukkan kelahiran anak betina sapi sebesar 65%. Dapat disimpulkan bahwa IB menggunakan sexed sperma hasil pemisahan dengan kolom AT dapat meningkatkan persentase kelahiran anak sapi perah betina.

Kata Kunci: Albumin Telur, Kolom, Waktu Pemisahan, Ukuran Sperma, Anak Betina

PENDAHULUAN

Teknologi pemisahan sperma telah banyak dilakukan dan mungkin bisa mempengaruhi efisiensi biologis dan ekonomis. Beberapa keuntungan dengan

keberhasilan mendapatkan *sexed* spermatozoa antara lain peternak sapi perah menginginkan anak kelahiran betina untuk produksi susu dan peternak sapi potong lebih menginginkan anak jantan untuk pertumbuhan

yang lebih cepat. Produksi sexed spermatozoa memungkinkan jumlah betina yang diperlukan lebih sedikit untuk produksi heifer, memfasilitasi konservasi ternak potensi penuh (Prasad et al. 2010), memungkinkan crossbreeding yang lebih luas dan penggunaan betina yang lebih sedikit untuk program progeny (Hohenboken 1999).

Usaha untuk pemisahan spermatozoa dapat dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran, motilitas, berat, density, *surface charge*. Susilawati et al. (1999) melaporkan rata-rata panjang kepala $8,75 \pm 0,25 \mu\text{m}$, dan rata-rata lebar kepala $4,12 \pm 0,22 \mu\text{m}$. Hasil pengukuran besar kepala spermatozoa (panjang x lebar) pada semen segar diperoleh rata-rata $32,75 \pm 2,36 \mu\text{m}^2$. Luas area kepala spermatozoa $34,5 \mu\text{m}^2$ dan perbandingan DNA sperma X dan Y sebesar 3,8% dilaporkan oleh Garner (2006). Dibandingkan dengan spermatozoa X, spermatozoa Y memiliki kepala yang lebih kecil, lebih ringan dan lebih pendek, sehingga spermatozoa Y lebih cepat bergerak. Spermatozoa Y dilaporkan memiliki DNA yang lebih sedikit (Ericsson dan Glass 1982). Spermatozoa X mengandung kromatin lebih banyak, sehingga mengakibatkan ukuran kepala spermatozoa X lebih besar (Hafez dan Hafez 2000). Karena spermatozoa Y bergerak lebih cepat akan diikuti kematian yang lebih cepat pula dibandingkan sperma X. Sebaliknya spermatozoa X lebih tahan hidup karena hemat energi. Usaha pemisahan spermatozoa telah banyak dilakukan antara lain dengan filtrasi menggunakan sephadex (Dowson et al. 1986), dengan gradient Percoll (Iizuka et al. 1987), elektroporesis (Blottner et al. 1994; Ainsworth et al. 2007), swim-up (Garner dan Hafez 2000). Teknik pemisahan dengan filtrasi didasarkan atas perbedaan ukuran dan berat spermatozoa. Spermatozoa dengan berat lebih besar akan turun lebih dulu, kemudian diikuti spermatozoa yang lebih kecil yang bisa melewati gel akan turun kemudian. Filtrasi menggunakan gel sephadex merupakan separasi kromatografi berdasar afinitas. Molekul-molekul sephadex yang bersilang menjamin penyaringan yang selektif. Kekuatan mekanis sephadex tergantung pada tingkat ikatannya (*cross linking*) (Dowson et al. 1986). Teknologi dengan *flow cytometry* akhir-akhir ini telah dilaporkan dapat memisahkan spermatozoa X dan Y lebih akurat akan tetapi memerlukan keterampilan yang lebih tinggi untuk operasinya, peralatan yang kompleks dan mahal (Johnson et al. 1994; Seidel et al. 1997; Seidel dan Johnson 1999; Seidel dan Garner 2002; Garner 2006). Walaupun ketersediaan sexed sperm dengan flow cytometer secara komersial sekarang sudah ada (Rhinehart 2009) dan ketepatan jenis kelamin anak yang diharapkan bisa mencapai 85-95% (Garner 2001) akan tetapi dari aspek ekonomisnya masih dipertanyakan (De Vries 2012) mengingat harga straw

yang lebih mahal dan persentase kebuntingan yang lebih rendah dibanding semen yang konvensional.

Pemisahan spermatozoa dengan kolom albumin

Albumin merupakan makromolekul protein yang banyak digunakan dalam media kultur, misalnya *Bovine Serum Albumin* (BSA) bersifat melindungi sperma dari lipid peroksidase. Hal ini terbukti bahwa penambahan BSA dalam media skim milk dan plasma semen meningkatkan presentase motilitas dan motilitas progresif pada awal inkubasi. Sifat-sifat BSA tersebut memberi peluang yang lebih besar penggunaannya dalam pengencer untuk manipulasi semen. Salah satu diantaranya yaitu sebagai media pemisah sperma X dan Y baik pada manusia maupun pada hewan. Metode pemisahan dengan menggunakan kolom albumin didasarkan pada perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y. Prinsip dari metode ini adalah membuat medium yang berbeda konsentrasinya, sehingga spermatozoa yang mempunyai motilitas tinggi (Y) akan mampu menembus medium dengan konsentrasi albumin yang lebih tinggi, sedangkan spermatozoa X akan tetap berada pada medium dengan konsentrasi albumin yang lebih rendah (Maxwell et al. 2004). Henri (1992) pada sperma kambing menggunakan kolom BSA 6% sebanyak 6 ml, menghasilkan rasio jenis kelamin 38,5% jantan dan 61% betina untuk inseminasi dengan fraksi atas, serta 83% jantan dan 16,7% betina untuk inseminasi dengan fraksi bawah. Sedangkan Jaswandi (1992) melakukan pemisahan sperma sapi dengan menggunakan BSA 6% (fraksi atas sebanyak 3 ml) dan 10% (fraksi bawah sebanyak 3 ml). Hasil penelitian menunjukkan bahwa inseminasi dengan fraksi bawah memperoleh 62,5% jantan dan 37,5% betina, sedangkan inseminasi fraksi bagian tengah diperoleh 22,2% jantan dan 77,8% betina. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Somarny et al. (2011) dimana pemisahan spermatozoa sapi menggunakan BSA dengan konsentrasi 15 dan 20% untuk meningkatkan spermatozoa Y yang dievaluasi dengan teknik *Fluorescence in situ hybridization* tidak efektif dan rasio sperma X dan Y sebelum pemisahan dan sesudah pemisahan tidak berbeda secara statistik. Albumin telur (AT) ayam dapat digunakan sebagai albumin alternatif pengganti BSA (*Bovine Serum Albumin*) dalam proses pemisahan spermatozoa dan dianggap cukup layak untuk digunakan. Metode ini mudah sekali diterapkan di lapang, karena bahan utamanya mudah diperoleh dan terjangkau. Hasil penelitian tersebut menunjukkan, konsentrasi albumin 10 dan 30% mampu mengubah proporsi perolehan spermatozoa dari kondisi normal. Penelitian yang dilakukan oleh Pancahastana (1999) tentang pemisahan spermatozoa dengan AT diperoleh rata-rata persentase spermatozoa Y pada lapisan atas

adalah $36,80 \pm 8,06\%$ dan untuk lapisan bawah yaitu $77,20 \pm 4,09\%$. Hasil yang sama dilaporkan oleh Haryati (2003), sperma X didapat 75,7% pada fraksi atas setelah pemisahan spermatozoa sapi dengan kolom AT selama 30 menit. Penambahan glutathion dan kolesterol pada media pemisahan sperma X dan Y menggunakan AT dapat mempertahankan kualitas spermatozoa pasca pemisahan (Sianturi et al. 2008).

MATERI DAN METODOLOGI

Koleksi semen

Untuk kegiatan pertama di Balai Penelitian ternak, dua ekor sapi pejantan dewasa *Friesian Holland* (FH) dengan berat badan berkisar 800-900kg digunakan sebagai sumber semen. Sapi pejantan tersebut ditempatkan pada kandang individu dan diberi pakan rumput dan minum secara *ad libitum* serta konsentrat sebanyak 8 kg/hari/ekor sebagai suplementasi. Semen ditampung 2 x seminggu dengan menggunakan Vagina Buatan (VB). Segera setelah penampungan, semen dievaluasi secara makroskopis berupa, volume, warna, konsistensi dan mikroskopis berupa konsentrasi, persentase motil (% M), persentase hidup (% H), persentase tudung akrosom utuh (% TAU) dan morphometrik. Semen dengan kualitas baik saja yaitu semen dengan persentase motilitas diatas 70% dan persentase abnormalitas dibawah 10% saja yang digunakan dalam penelitian ini.

Pembuatan media dan kolom albumin telur (AT)

Media pengencer dasar yang digunakan adalah Tris Citrat Buffer dengan 20% kuning telur (KT) sebagai kontrol. Pemisahan spermatozoa dilakukan dengan membuat 2 kolom AT sebanyak masing masing 3 ml media pengencer yang mengandung 10 dan 30% AT dan komposisi media pengencer terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi pengencer Tris-Citrat mengandung 10 dan 30% albumin telur

Bahan	Pengencer	
	10% AT	30% AT
Tris Hydroxil Methyl Amine,g	2,422	2,422
Asam Citrat, g	1,340	1,340
Fruktose, g	1,000	1,000
Kuning telur, ml	20	20
Streptomycin, mg	100	100
Penicilin, IU	100000	100000
Putih telur, ml	10	30
Aquades, ml	70	50

Pertama kali sebanyak 3 ml media pengencer dengan 30% AT dimasukkan kedalam syring dengan diameter 1 cm (Kolom Bawah) kemudian diikuti dengan 3 ml media yang mengandung 10% AT (Kolom Atas), sehingga tinggi masing masing kolom adalah 3 cm.

Pemisahan spermatozoa

Pooled semen segar yang telah dievaluasi dan layak untuk dipisahkan diencerkan 1:1 dengan media Tris Citrat kontrol dan masing masing 1 ml dimasukkan diatas KA (10% AT). Ada 3 waktu pemisahan yaitu 10, 20 dan 30 menit sebagai perlakuan dengan ulangan sebanyak 13 kali waktu penampungan. Setelah waktu pemisahan, semen dipanen dengan jalan drainase dimana panen 3 ml pertama dikategorikan sebagai KB yang diharapkan berisi sperma yang kaya dengan sperma Y, kemudian 3 ml berikutnya sebagai KA yang kaya dengan sperma X. Hasil pemisahan masing masing kolom diencerkan dengan 6 ml pengencer Tris Citrat kontrol, dan disentrifus 2500 rpm selama 5 menit untuk mencuci sperma dari larutan AT. Supernatan secepatnya dibuang dan endapan yang terjadi diencerkan kembali dengan pengencer Tris Citrat kontrol untuk mendapatkan konsentrasi 100 juta sperma/ml. Data yang dicatat adalah ukuran spermatozoa dari masing masing kolom, dan daya hidup spermatozoa (% M, % H dan IAR). Rancangan penelitian adalah rancangan acak lengkap dengan 3 waktu pemisahan sebagai perlakuan dengan 13 ulangan penampungan. Teknik pemisahan yang terbaik yang diukur dari rataan perbedaan luas kepala sperma dari kedua kolom yang terbesar dan daya hidup yang tertinggi kemudian digunakan untuk produksi sexed sperm di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Jawa Barat.

Pembekuan sperma hasil pemisahan dan inseminasi buatan (IB)

Pada kegiatan kedua, semen ditampung dari 7 ekor pejantan FH milik BIB Lembang, Jawa Barat dan dilakukan pemisahan mengikuti teknik dan metodologi yang terbaik dari kegiatan pertama yang dilakukan pada tingkat Balai Penelitian Ternak-Ciawi. Semen dari KA yang diharapkan kaya akan sperma X diencerkan pada pengencer Tris Citrate dengan 20% V/V KT dan 7,4% V/V, didinginkan ke 5°C selama 45 menit, ekuilibrisasi selama 3 jam dan dibekukan dengan meletakkan straw 8 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 10 menit kemudian disimpan dalam nitrogen cair minimum 1 minggu sebelum IB. Produksi dan penyimpanan dilakukan di Laboratorium BIB Lembang, Jawa Barat. Inseminasi buatan dilakukan pada ternak betina FH milik peternak atau KUD diberbagai lokasi penelitian

lapangan dan di Balai Penelitian Ternak-Ciawi. Inseminasi dilakukan trans vaginal dengan teknik palpasi rektal oleh inseminator yang sudah terlatih sedangkan pemeliharaan mengikuti manajemen yang dilakukan masing masing peternak.

Data yang dicatat

Morphometrik

Ukuran panjang (P), lebar (L) kepala spermatozoa yang terbesar diukur menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan mikrometer terhadap 600 spermatozoa segar dan masing masing 50 spermatozoa per ulangan pada setiap perlakuan. Sedangkan luas spermatozoa dihitung berdasarkan rumus $(0,8998 \times P \times L) - 1,63$. Spermatozoa dengan luas kepala yang lebih besar dikategorikan sebagai spermatozoa X dan sebaliknya luas kepala yang lebih kecil dikategorikan sebagai sperma Y.

Kualitas semen

Persentase motilitas (% M) dievaluasi pada paling sedikit 3 lapangan pandang menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran objektif 40x dengan nilai 0-100%.

Persentase sperma hidup (% H). Dengan pewarnaan eosin negrosin menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 100x terhadap paling sedikit 100 spermatozoa per pengamatan dengan nilai 0-100%. Spermatozoa yang mati terlihat berwarna merah sedangkan yang hidup transparan.

Persentase tudung akrosom utuh (% TAU) dievaluasi dengan menggunakan phase kontras mikroskop pembesaran objektif 100x. Tudung akrosom yang utuh akan terlihat berwarna hitam dibawah lensa objektif positif. Total spermatozoa yang diamati paling

sedikit 100 spermatozoa dan nilai yang digunakan 0-100%.

Persentase kebuntingan dan jenis kelamin anak

Pada tingkat lapangan persentase kebuntingan dilakukan dengan teknik palpasi rektal 2 bulan setelah IB sedangkan di tingkat Institusi (Balai Penelitian Ternak Ciawi) pemeriksaan kebuntingan dilakukan dengan teknik *Ultra Sonography* (USG) 1 bulan setelah IB. Jenis kelamin anak ditentukan secara visual setelah kelahiran. Seluruh data yang diperoleh kemudian dianalisa secara statistik mengikuti Steel dan Torrie (1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan semen segar secara makroskopik maupun mikroskopik dari pengamatan 13 kali penampungan sebagai ulangan dikategorikan baik dan menunjukkan gambaran karakteristik semen sapi yang normal sehingga layak untuk dipakai untuk penelitian (Tabel 2).

Hasil pengamatan morfometri terhadap masing masing 250 dan 350 untuk spermatozoa pejantan 1 dan 2 didapat perbedaan ukuran akan tetapi perbedaan yang didapat tidak nyata secara statistik. Perbedaan ukuran yang didapat pada penelitian ini hampir sama dengan yang dilaporkan oleh Susilawati et al. (1999) yang melaporkan rata-rata panjang kepala 8,75 µm, dan rata-rata lebar kepala 4,12 µm. Hasil yang serupa dilaporkan oleh Garner (2006) dimana panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa sapi adalah berturut-turut 9,1 µm; 4,7 µm dan 34,5 µm². Telah banyak dilaporkan bahwa perbedaan ukuran spermatozoa dari berbagai ternak mamalia berhubungan dengan jumlah DNA, bahkan didapat juga perbedaan diantara individu dan bangsa sapi (Garner 2006).

Tabel 2. Rataan kualitas semen segar dan ukuran spermatozoa hasil penampungan sebelum dilakukan pemisahan

Penilaian	Pejantan		Rata-rata
	1	2	
Volume, ml	5,93	5,94	5,94
Warna	Krem keputihan	Krem keputihan	
Konsistensi	Agak kental	Agak kental	
Konsentrasi, juta/ml	1615	1451	1583
Gerakan massa	+++	+++	
Motilitas, %	83,8	79,4	81,6
Sperma Hidup, %	90,1	86,4	88,3
Tudung Akrosom Utuh, %	77,7	77,6	77,7
Panjang kepala sperma, µm	8,51	8,58	8,55
Lebar kepala sperma, µm	4,70	4,87	4,78
Luas kepala, µm ²	34,40	35,94	35,2

Usaha untuk memisahkan spermatozoa X dan Y dengan menggunakan kolom putih telur yang didasarkan atas perbedaan motilitas sperma X dan Y terbukti dengan rataan ukuran panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa yang berbeda dari spermatozoa KA dan KB (Tabel 3).

Tabel 3. Rataan panjang (μm), lebar (μm) dan luas kepala (μm^2) spermatozoa dari kolom atas dan bawah pasca pemisahan menggunakan kolom albumin telur

Waktu Pemisahan	Kolom atas (KA)			Kolom bawah (KB)		
	P	L	LA	P	L	LA
10 Menit	8,7	4,8	36,1	8,4	4,7	33,8
20 Menit	8,7	4,7	36,2	8,4	4,7	33,9
30 Menit	8,6	4,7	34,8	8,4	4,6	33,3
Rataan	8,7	4,7	35,7	8,4	4,6	33,7

P = Panjang; L= Lebar; LA = Luas

Dari 13 ulangan pengukuran dengan masing masing 50 spermatozoa setiap ulangan menunjukkan rataan panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa yang didapat dari KA lebih besar dibandingkan dengan spermatozoa dari KB. Hasil ini akibat perbedaan rasio sperma X dan Y yang berbeda pada setiap kolom. Sperma Y dengan motilitas yang lebih tinggi bergerak lebih cepat menembus media pemisahan sehingga persentase sperma Y lebih banyak terdapat pada KB dan sebaliknya KA lebih banyak dengan sperma X yang motilitasnya lebih lambat. Ukuran sperma Y yang lebih kecil dari sperma X dari ternak mamalia akibat perbedaan DNA telah banyak dilaporkan (Kaneko et al. 1983; Johnson 2000; Hafez dan Hafez 2000; Garner 2001; Garner dan Seidel 2003; Maxwell et al. 2004), dan perbedaan ini telah digunakan untuk usaha pemisahan kedua jenis sperma tersebut. Hasil yang hampir sama dilaporkan oleh Haryati (2003) dimana 75% spermatozoa dari fraksi atas mempunyai luas yang lebih besar dari luas rataan populasi spermatozoa. Penelitian yang dilakukan oleh Pancastana (1999) untuk usaha pemisahan spermatozoa menggunakan kolom putih telur melaporkan rata-rata persentase spermatozoa Y pada lapisan atas adalah $36,80 \pm 8,06\%$ dan untuk lapisan bawah yaitu $77,20 \pm 4,09\%$. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Somarny et al. (2011), bahwa pemisahan dengan kolom BSA tidak efektif memisahkan sperma X dan Y dimana rasio sperma X dan Y (49 : 51%) sebelum pemisahan tidak berbeda nyata dengan sesudah pemisahan (46 : 53%).

Berdasarkan rataan, panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa menunjukkan pengaruh waktu pemisahan tidak nyata mempengaruhi ukuran kepala spermatozoa. Didapat kecenderungan rataan panjang, lebar dan luas kepala spermatozoa KA menurun dengan waktu pemisahan selama 30 menit. Jika tingkat keberhasilan pemisahan sperma didasarkan atas asumsi ukuran

kepala spermatozoa, maka pemisahan dengan waktu 10 da 20 menit cenderung lebih baik dibandingkan waktu pemisahan 30 menit dimana perbedaan luas kepala spermatozoa antara KA dan KB adalah berturut turut 2,3; 2,3 dan $2,0 \mu\text{m}^2$ (Tabel 3) untuk masing masing waktu pemisahan 10; 20 dan 30 menit. Tidak didapat perbedaan yang nyata antara waktu pemisahan 10 dan 20 menit, akan tetapi penelitian terdahulu menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa yang didapat pada KB lebih tinggi dengan bertambahnya waktu pemisahan (Haryati 2003) sehingga waktu pemisahan yang optimal dianjurkan adalah 20 menit. Tinggi kolom yang hanya masing masing 3 cm sehingga jarak antara sampel sebelum pemisahan sampai dengan dasar KB hanya berkisar 6 cm saja dan jarak ini sudah bisa ditempuh oleh spermatozoa dengan kecepatan spermatozoa yang normal kurang dari 10 menit. Pada perkawinan alam spermatozoa dideposit di vagina dan telah dapat melalui cervix dalam waktu hanya 2 sampai 10 menit dan sejumlah spermatozoa yang bergerak cepat dapat menempuhnya antara 1,5 sampai dengan 3 menit (Hafez dan Hafez 2000).

Pengaruh pemisahan dan waktu pemisahan terhadap kualitas semen terlihat pada Tabel 4. Persentase motilitas (% M), % H dan % TAU tidak berbeda nyata secara statistik antara sperma dari KA dan KB.

Tabel 4. Rataan persentase motil (% M), sperma yang hidup (% H) dan tudung akrosom utuh (% TAU) dari kolomi atas dan bawah

Waktu (menit)	Kolom atas (KA)			Kolom bawah (KB)		
	% M	%H	%TAU	%M	%H	%TAU
10	79,4	85,9	78,9	79,0	83,5	79,4
20	77,5	85,4	78,2	76,5	83,8	78,2
30	76,4	85,0	77,3	72,8	83,1	77,5
Rataan	77,8	85,5	78,1	76,1	83,5	78,4

Juga pengaruh waktu pemisahan tidak nyata secara statistik terhadap kualitas semen. Rataan % M, % H dan % TAU adalah 79,2; 84,7; 79,2; 77,0; 84,6; 78,2 dan 74,6; 84,0; 77,4 untuk masing masing waktu pemisahan 10; 20 dan 30 menit. Didapat kecenderungan bahwa persentase motil (% M) setelah pemisahan 30 menit lebih rendah dibanding dengan pemisahan 20 dan 10 menit. Dengan bertambahnya waktu pemisahan, metabolisme akan juga meningkat sehingga akan menurunkan kualitas sperma akan tetapi perbedaan ini tidak nyata secara statistik.

Persentase kelahiran betina

Pemeriksaan kebuntingan dengan teknik palpasi rektal diberbagai lokasi penelitian menunjukkan tingkat kebuntingan berkisar antara 53-60%. Penggunaan *sexed*

sperma telah banyak dilaporkan dimana hasil kebuntingan didapat cenderung menurun akibat konsentrasi sperma yang digunakan dan pengaruh proses pemisahan (Garner dan Seidel 2003, 2008; Dejamette et al 2008). Peningkatan kelahiran anak betina dari IB menggunakan spermatozoa dari KA dan pengaruh pejantan dari total 160 ekor kelahiran terlihat pada Tabel 5 dan 6.

Ukuran spermatozoa yang lebih besar pada KA dibandingkan dengan KB yang membuktikan perbedaan rasio sperma X dan Y yang berbeda pula pada setiap kolom dimana ukuran spermatozoa yang lebih besar pada KA sangat berkorelasi dengan persentase sperma X yang lebih besar pula. Hal ini terbukti dengan kelahiran anak betina yang meningkat menjadi 65%. Secara teoritis rasio jenis kelamin kelahiran anak sapi adalah 50 : 50 untuk anka jantan dibanding betina. Pada pengamatan yang berbeda di tingkat Balai penelitian Ternak, Ciawi menunjukkan 33 ekor anak betina (48,5%) dari total 68 ekor kelahiran. Ketepatan pemisahan sperma X dan Y dengan kolom albumin telur tidak seakurat pemisahan dengan flowcytometer dimana akurasi hasil yang didapat bisa mencapai 90%, akan tetapi metode ini lebih aplikatif digunakan dilapangan karena sangat mudah dan tidak memerlukan peralatan yang kompleks dan mahal. Hasil yang sama dilaporkan oleh peneliti sebelumnya dimana IB menggunakan sperma dari fraksi atas akan meningkatkan kelahiran betina dan sebaliknya sperma dari fraksi bawah menghasilkan anak jantan yang lebih tinggi (Jaswandi 1992; Saili 1999).

Tabel 5. Persentase anak kelahiran betina hasil IB menggunakan semen dari kolom atas dari pemisahan sperma X dan Y dengan kolom putih telur

Lokasi	Jenis kelamin anak	
	Jantan	Betina
PT Taurus	13 (40,6%)	19 (59,4%)
Kud Giritani	8 (25,0%)	24 (75,05%)
Barastagi	2 (23,3%)	4 (66,7%)
Balitnak/Institusi	33 (36,7%)	57 (63,3%)
Total	56 (35,0%)	104 (65,0%)

Perbedaan persentase kelahiran anak betina di berbagai lokasi penelitian dipengaruhi perbedaan manajemen pemeliharaan khususnya pemberian pakan hijauan maupun konsentrat. Perbedaan pakan akan mempengaruhi keasaman uterus yang juga akan mempengaruhi daya hidup sperma X dan Y.

Tabel 6. Pengaruh pejantan terhadap kelahiran anak betina setelah IB menggunakan sperma dari KA hasil pemisahan sperma X dan Y menggunakan kolom putih telur

Pejantan	Total	Anak betina	%
Aowen	20	13	65,0
Fortuner	42	29	69,0
Filmor	45	28	62,2
Flawn	6	4	66,6
Fervent	6	4	66,6
Fokker	24	15	62,5
Forsa	17	11	64,7
Total	160	104	65,0

KESIMPULAN

Pemisahan spermatozoa X dan Y dapat dilakukan menggunakan dua kolom albumin telur dengan konsentrasi 10 dan 30% V/V pada pengencer Tris-Citrat, dan waktu pemisahan dapat dilakukan sampai dengan 30 menit. Inseminasi Buatan (IB) menggunakan semen dari Kolom Atas (KA) meningkatkan kelahiran anak betina sapi perah sampai dengan 65% dari rasio secara teoritis sebesar 50%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Jawa Barat yang menyiapkan fasilitas dan pejantan untuk produksi dan pemisahan sperma X dan Y. Juga ucapan terima kasih terhadap PT Taurus, KUD Giri Tani, Perusahaan di Brastagi yang berpartisipasi dalam penyediaan ternak betina untuk IB menggunakan sexed sperma.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainsworth C, Nixon B, Jansen RPS, Aitken RJ. 2007. First recorded pregnancy and normal birth after ICSI using electrophoretically isolated spermatozoa. *Hum Reprod.* 22:197-200.
- Blottner S, Bostedt H, Mewes K, Pitra C. 1994. Enrichment of bovine X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis. *Zentralbl Veterinarmed A.* 41:466-74.
- De Vries A. 2012. The economics of sexed semen in dairy heifers and cows. University of Florida IFAS Extension AN 214. <http://edis.ifas.ufl.edu/an214>.
- Dejamette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci.* 91:1778-1785.

- Dowson RMC, Elliot, DC, Elliot WH, Jones KM. 1986. Data for biochemical research. 3rd ed. Oxford: Oxford Science Publication.
- Ericsson RJ, Glass RH. 1982. Functional differences between sperm bearing the X- or Y-chromosome. In: Amann RP, Seidel GE, Jr, editors. Prospects for sexing mammalian sperm. Boulder (CO): Colorado University Associated Press. p. 201-211.
- Garner DL. 2001. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J Androl.* 22:519-526.
- Garner DL. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology.* 65:943-957.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez ESE, Hafez B, editors. *Reproduction in farm animal.* 7th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins. p. 96-109.
- Garner DL, Seidel GE. 2003. Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Can. J Anim Sci.* 83:375-384.
- Garner DL, Seidel GE. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology.* 69:886-895.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. X and Y chromosome-bearing spermatozoa. In: Hafez ESE, Hafez B, editors. *Reproduction in farm animals.* 7th ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins. p. 390-394.
- Haryati, T. 2003. Pengaruh penambahan Isobutyl Methyl Xanthine (IBMX) kedalam albumen sebagai media separasi spermatozoa pembawa kromosom X dan Y. (skripsi S1). [Bogor (Indones)]: Universitas Pakuan Bogor.
- Henri. 1992. Usaha mengubah rasio sperma X dan Y dengan metode kolom menggunakan larutan Bovine Serum Albumin (BSA) dan penilaian angka kebuntingan serta perbandingan jenis kelamin anak pada kambing (tesis S2). [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.
- Hohenboken WD. 1999. Application of sexed semen in cattle production. *Theriogenology.* 52:1421-1433.
- Iizuka R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T. 1987. Sexing of human sperm discontinuous percoll density gradient and its clinical application. *Hum Reprod.* 2:573-575.
- Jaswandi. 1992. Penggunaan lapisan suspensi bovine serum albumin 6 dan 10 persen dalam kolom untuk memisahkan sperma sapi pembawa kromosom X dan Y guna mengubah rasio sex pedet (tesis S2). [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.
- Johnson LA. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Anim Reprod Sci.* 61:93-107.
- Johnson LA, Cran DG, Polge C. 1994. Recent advances in sex preselection of cattle: Flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm based on DNA to produce progeny. *Theriogenology.* 41:51-56.
- Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T, Lizuka R. 1983. Separation of human X and Y bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. *Fertil Sterile.* 40:235-240.
- Maxwell WM, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, de Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK. 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci.* 82:79-85.
- Pancahastana H. 1999. Upaya merubah sex rasio spermatozoa dengan melakukan pemisahanspermatozoa X dan Y menggunakan putih telur pada sapi Bali (skripsi S1). [Malang (Indones)]: Universitas Brawijaya.
- Prasad S, Rangasamy S, Satheshkumar S. 2010. Sex preselectionin domestic animals. Current status and future prospects. *Vet World.* 3:346-348.
- Rhinehart, J.D. 2009 Sex-sorted semen for beef cow-calf production. Mississippi State University Extension Service. P 2559. <http://msucare.com/pubs/publications/p2569.pdf>.
- Saili, T. 1999. Efektifitas penggunaan albumin sebagai medium separasi dalam upaya mengubah rasio alamiah spermatozoa pembawa kromosom X dan Y pada sapi (tesis S2). [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.
- Seidel GE, Garner DL. 2002. Current status of sexing spermatozoa. *Hum Reprod.* 124:733-743.
- Seidel Jr. GE, Johnson LA. 1999. Sexing mammalian sperm-overview. *Theriogenology.* 52:1267-1272.
- Seidel, Jr. GE., Allen CH, Johnson LA, Holland MD, Brink Z, Welch GR, Graham JE, Cattell MB. 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology.* 48:1255-1265.
- Sianturi RG, Situmorang P, Triwulaningsih E, Kusumaningrum DA. 2008. Pengaruh penambahan glutathione dan kolesterol pada pemisahan spermatozoa X dan Y dengan metode kolom albumin telur. Darmono, Wina E, Nurhayati, Sani Y, Prasetyo LH, Triwulaningsih ET, Sendow I, Natalia L, Priyanto D, Indraningsih, Herawati T, penyunting. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* Bogor, 21-22 Agustus 2007. Bogor (Indones): Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. hlm. 207-213.
- Somarny WWMZ, YJ Tan, Mat Tasol S, Jasmi Y, Mussadin K, Johari JA. 2011. Separation of Y-chromosome bearing bull's spermatozoa using an albumin gradient technique. *Mal J Anim Sci.* 14:13-19.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan prosedur statistika.* Jakarta (Indones): PT Gramedia Utama.
- Susilawati T, Sumitro SB, Hardjopranjoto S, Mantara Y, Nuryadi, 1999. Pola kapasitas spermatozoa X dan Y sapi hasil pemisahan menggunakan filtrasi sephadex dan sentrifugasi gradien densitas percoll. *J Ilmu-ilmu Hayati.* 11:29-40.