

Mikroenkapsulasi Spermatozoa Sapi: Daya Hidup Spermatozoa pada Media Alginat-Kuning Telur

Kusumaningrum DA¹, Purwantara B², Yusuf TL², Situmorang P¹

¹Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB, Dramaga Bogor
E-mail: da_kusumaningrum@yahoo.com

(Diterima 12 Januari 2015; direvisi 13 Maret 2015; disetujui 17 Maret 2015)

ABSTRACT

Kusumaningrum DA, Purwantara B, Yusuf TL, Situmorang P. 2015. Microencapsulation of bull spermatozoa: Its viability in alginate-egg yolk media. JITV 20(1): 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v20i1.1110>

Microencapsulation of spermatozoa is a process to entrap a number of spermatozoa in microcapsule. Alginate, as a natural polymer polysaccharide is commonly used in cell microencapsulation. Tris Yolk Citrate buffer is a good buffer for spermatozoa dilution, therefore this experiment aimed to determine optimal concentration of alginate and egg yolk to sperm quality in bull spermatozoa microencapsulation. Concentration of egg yolk and alginate in media of encapsulation were determined in applications of sperm microencapsulation. Four bulls were used as semen source and only semen with good quality were used in this study. Pooled semen was diluted using the medium to get final concentration 100×10^6 cell/ml. The first study was conducted to determine the effect of concentration of alginate (0, 1, and 1.5%) on viability of spermatozoa. The second study to determine the effect of alginate concentration, egg yolk and its interaction was done by comparing two levels of alginate (1 and 1.5%) with four levels of egg yolk (5, 10, 15 and 20%). Viability of spermatozoa, motility (M), live spermatozoa (L) and Intact Apical Ridge (IAR) were observed at 0, 1, 2 and 3 h incubation at room temperature. Results indicated that alginate concentration increased the osmolality and viscosity but did not affect pH of the medium. The osmolality and viscosity of medium were 275, 325, 425 and 1.12, 26.62, 47.98 for concentration of alginate 0, 1 and 1.5% respectively. Percentage of motility is significantly lower ($P < 0.05$) in alginate medium than those of control, and 1.5% alginate could produce more uniform beads. Concentration of alginate, egg yolk and its interaction did not significantly affect viability of sperm. It is concluded that the combination of 1.5% alginate with 5, 10, 15 or 20% egg yolk can be used as media for sperm encapsulation.

Key Words: Microencapsulation, Spermatozoa, Sodium Alginate, Egg Yolk, Viability

ABSTRAK

Kusumaningrum DA, Purwantara B, Yusuf TL, Situmorang P. 2015. Mikroenkapsulasi spermatozoa sapi: Daya hidup spermatozoa pada media alginat-kuning telur. JITV 20(1): 1-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v20i1.1110>

Mikroenkapsulasi spermatozoa adalah proses untuk menjebak sekumpulan spermatozoa dalam suatu mikrokapsul. Alginat merupakan polimer polisakarida alami yang umum digunakan dalam mikroenkapsulasi sel. Tris citrat kuning telur merupakan bufer yang baik untuk pengenceran spermatozoa. Dalam penelitian ini konsentrasi alginat dan kuning telur yang optimal bagi daya hidup spermatozoa dalam mikroenkapsulasi spermatozoa sapi diteliti. Empat ekor sapi pejantan digunakan sebagai sumber semen, hanya semen yang memenuhi syarat digunakan dalam penelitian. Gabungan sampel semen diencerkan menggunakan media enkapsulasi untuk mendapatkan konsentrasi 100×10^6 /ml. Penelitian pertama dilakukan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi alginat (0, 1 dan 1,5%) terhadap viabilitas spermatozoa. Penelitian kedua untuk mengetahui pengaruh konsentrasi alginat, kuning telur serta interaksinya, dengan membandingkan dua level alginat (1% vs 1,5%) dengan empat level kuning telur (5, 10, 15 dan 20%). Viabilitas spermatozoa meliputi motilitas (M), spermatozoa hidup (H) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) diamati pada 0, 1, 2 dan 3 jam pada suhu ruang. Pengamatan menunjukkan konsentrasi alginat meningkatkan osmolalitas dan viskositas media namun tidak pada pH media. Osmolalitas dan viskositas media yaitu: 275, 325, 425 dan 1,12; 26,62; 47,98 berturut-turut untuk konsentrasi alginat 0,1 dan 1,5%. Persentase motilitas spermatozoa lebih rendah ($P < 0,05$) pada media yang mengandung alginat dibandingkan dengan kontrolnya dan 1,5% alginat menghasilkan bentuk mikrogel yang lebih beraturan. Konsentrasi alginat, kuning telur dan interaksinya tidak berpengaruh nyata terhadap viabilitas spermatozoa. Dapat disimpulkan bahwa, alginat 1,5% dapat dikombinasikan dengan kuning telur dalam konsentrasi 5, 10, 15 dan 20% untuk digunakan sebagai media enkapsulasi.

Kata Kunci: Mikroenkapsulasi, Spermatozoa, Natrium Alginat, Kuning Telur, Daya Hidup

PENDAHULUAN

Mikroenkapsulasi adalah suatu proses untuk menjebak suatu substansi baik berupa materi padat, cair, gas maupun sel hidup dalam suatu membran membentuk suatu mikrokapsul (Wang et al. 2006) dalam material polimer yang tidak membahayakan (Nebel et al. 1985). Sementara itu, menurut Kinasiewicz (2008) mikroenkapsulasi merupakan prosedur dimana material biologi (dalam hal ini sekumpulan sel spermatozoa) dibungkus dalam semi permeabel kontainer dengan diameter 0,2-3 mm.

Teknologi mikroenkapsulasi spermatozoa dikembangkan untuk meningkatkan efisiensi inseminasi buatan yaitu untuk mengatasi masalah yang berhubungan dengan waktu inseminasi, sehingga inseminasi dapat dilakukan pada waktu yang lebih awal. Apabila teknologi ini sukses diaplikasikan maka akan membawa keuntungan ekonomis pada sistem produksi ternak karena tidak lagi diperlukan identifikasi estrus, terutama bago hewan non domestikasi sulitnya deteksi periode kawin akan dapat teratasi (Watson 1993). Melalui teknologi mikroenkapsulasi diharapkan spermatozoa dapat tinggal lebih lama dalam saluran reproduksi betina dan siap menunggu terjadinya ovulasi.

Beberapa biomaterial alami telah diteliti dan diaplikasikan dalam enkapsulasi dan mikroenkapsulasi sel seperti polimer alami karbohidrat (alginat, kitosan, kombinasi antara alginat dan kitosan, *arabic gum*, agarosa, selulosa) dan polimer alami protein seperti albumin dan gelatin (Uludag et al. 2000; Wang et al. 2006). Meskipun polimer sintetik seperti biodegradable polylactic acid-co-glycolic acid (PLGA) and non-biodegradable methyl methacrylate and derivat derivatnya seperti hydroxyethyl methacrylate-methyl methacrylate (HEMA-MMA) lebih stabil, struktur maupun komposisinya lebih homogen dan lebih mudah dimanipulasi, namun dalam aplikasi enkapsulasi sel, *biocompatibility* menjadi prioritas utama. Polimer alami menunjukkan sifat yang rendah/non toksik, rendah reaksi imunologis, dan *biocompatible* (Wang et al. 2006) sehingga lebih cocok untuk digunakan sebagai material dalam aplikasi mikroenkapsulasi sel.

Alginat, polimer karbohidrat alami yang dihasilkan dari ekstraksi *brown seaweed*, merupakan material yang telah umum digunakan dalam pembentukan mikrokapsul. Polimer ini tersusun dari β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G) yang terikat dalam 1,4-glycosidic, dapat dijumpai dalam berbagai variasi komposisi rasio G/M, baik homogen GG dan MM maupun heterogen GM (Wang et al. 2006; Draget & Taylor 2011; Andianmanantoanina & Rinauda 2010; Goh et al. 2012). Kelebihan dari alginat dibandingkan dengan polimer lain adalah alginat dapat bereaksi pada kondisi yang sesuai bagi sel yaitu pada suhu ruang dan

pH netral, membentuk hidrogel yang sesuai bagi kehidupan sel. Hampir seluruh mikroenkapsulasi sel secara eksklusif diproduksi dari hidrogel, karena secara mekanik hidrogel mampu mengurangi iritasi yang disebabkan oleh gesekan. Hidrogel juga bersifat lembut dan lentur, bersifat hidrophilik yang menyebabkan tidak terdapat perbedaan tegangan antara lingkungan dengan jaringan (Uludag et al. 2000). Alginat mampu membentuk hidrogel dan tidak mengganggu fungsi metabolisme sel sehingga alginat aman digunakan sebagai media untuk proses enkapsulasi sel (de Vos et al. 2006).

Tris citrat kuning telur (TCK) merupakan media yang baik dan umum digunakan sebagai media pengencer spermatozoa, karena merupakan bufer yang baik. Pengencer TCK mengandung nutrisi yang lengkap bagi kehidupan spermatozoa, kandungan lechitin dan lipoprotein dalam kuning telur juga mampu memberikan perlindungan terhadap perubahan suhu selama preservasi pada suhu rendah.

Penggunaan alginat dalam media pengencer spermatozoa TCK telah sukses diaplikasikan dalam proses mikroenkapsulasi spermatozoa sapi, babi dan anjing dengan konsentrasi alginat 0,75-1,5% (Nebel et al. 1985; Nebel et al. 1993; Huang et al. 2005; Shah et al. 2010; Shah et al. 2011), 0,1-6% (Kommisrud et al. 2012), namun tidak ditemukan laporan mengenai daya hidup spermatozoa dalam media tersebut.

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi alginat dan kuning telur yang optimal digunakan sebagai media enkapsulasi spermatozoa sapi.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Reproduksi, Balai Penelitian Ternak pada bulan September-Desember 2012.

Empat ekor sapi Peranakan Friesien Holstein jantan berumur 3-5 tahun digunakan sebagai sumber semen. Semen di tampung menggunakan vagina buatan (VB) dua kali setiap minggunya dan hanya semen dengan kualitas baik (gerakan massa ++ - +++, atau dengan motilitas >70%) digunakan sebagai sampel. Untuk menghilangkan kekhawatiran faktor individu, makan sampel semen yang kualitasnya memenuhi syarat dari ejakulat dan individu yang berbeda dijadikan satu (pool semen) untuk digunakan sebagai satu ulangan penelitian. Koleksi semen dari waktu yang berbeda digunakan sebagai ulangan.

Kualitas semen segar dievaluasi baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi warna, bau, konsistensi, volume, sedangkan pengamatan mikroskopis meliputi gerakan massa, persentase spermatozoa hidup (H) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) dan konsentrasi. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan kamar hitung

Neubeur, H dihitung menggunakan preparat apus eosin-negrosin yang diamati menggunakan mikroskop cahaya, sedangkan TAU diamati menggunakan mikroskop fase kontras.

Semen yang memenuhi syarat diencerkan menggunakan media enkapsulasi sehingga konsentrasi akhir $100 \times 10^6/\text{ml}$. Dengan menggunakan mikroenkapsulator (Buchi 390, 750 Hz, 550 volt, tekanan 230-250), tetesan media ditampung menggunakan baker glass (100 ml) yang berisi 50 ml 1,5% CaCl_2 dalam NaCl fisiologis pada kondisi *striing*. Mikrogel yang terbentuk dicuci menggunakan NaCl fisiologis (3x). Mikrogel diamati secara makroskopik dan mikroskopik untuk mengetahui bentuk dan ukuran mikrogel yang didapat.

Untuk mengetahui pengaruh alginat terhadap lingkungan media, maka pH diukur menggunakan digital pH meter, osmolalitas diukur menggunakan Automatic Osmometer, Osmomatte dan viskositas diukur dengan viscometer ostwald. Pengukuran terhadap pH, osmolalitas dan viskositas dilakukan secara *sampling*.

Rancangan percobaan

Penelitian dilakukan dalam dua tahap kegiatan penelitian yaitu pengaruh alginat terhadap daya hidup spermatozoa dan pengaruh konsentrasi alginat dan kuning telur terhadap daya hidup spermatozoa.

Pengaruh Alginat terhadap daya hidup spermatozoa

Penelitian dilakukan dalam Rancangan Acak Lengkap dengan tiga perlakuan dan 6 ulangan. Media pengencer yang digunakan adalah modifikasi pengencer

TCK yang mengandung 5% kuning telur dengan konsentrasi alginat yang berbeda (Tabel 1).

Pengaruh konsentrasi alginat dan kuning telur terhadap daya hidup spermatozoa

Penelitian kedua dilakukan dalam Rancangan Acak Lengkap Pola Faktorial 2×4 dengan 6 kali ulangan. Sebagai faktor pertama adalah konsentrasi alginat (1% dan 1,5%), dan faktor kedua adalah konsentrasi kuning telur (KT = 5, 10, 15 dan 20%). Komposisi media pengencer tersaji dalam Tabel 2.

Data yang diamati adalah viabilitas spermatozoa meliputi M, H dan TAU yang diamati pada suhu ruangan pada waktu inkubasi 0, 1, 2 dan 3 jam.

Tabel 1. Komposisi media dengan konsentrasi alginat yang berbeda

Komposisi kimia	Alginat		
	0%	1%	1,5%
Tris (g)	3,027	3,027	3,027
Asam nitrat (g)	1,675	1,675	1,675
Fructose (g)	125	125	125
Penisillin (mg)	100	100	100
Streptomycin (IU)	100.000	100.000	100.000
Glutathione (mM)	1	1	1
Aquabidest (ml)	95	95	95
Kuning telur (ml)	5	5	5
Alginat (g)	0	1	1,5

Tabel 2. Komposisi media dengan konsentrasi alginat dan kuning telur yang berbeda

Komposisi media	Alginat 1%				Alginat 1,5%			
	Kuning telur				Kuning telur			
	5%	10%	15%	20%	5%	10%	15%	20%
Tris (g)	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03	3,03
Asam nitrat (g)	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68
Fructose (g)	125	125	125	125	125	125	125	125
Penisillin (mg)	100	100	100	100	100	100	100	100
Streptomycin (IU)	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
Glutathione (mM)	1	1	1	1	1	1	1	1
Aquabidest (ml)	95	90	85	80	95	90	85	80
Kuning telur (ml)	5	10	15	20	5	10	15	20
Alginat (g)	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5	1,5

Analisa statistik

Semua data yang diperoleh dianalisa menggunakan Analisa Variasi dengan prosedur GLM menggunakan SAS (versi 9.1), perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (Steel & Torrie 1993)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh alginat terhadap lingkungan media

Penambahan alginat dalam pengencer TCK menghasilkan perubahan lingkungan (Tabel 3) berupa perubahan osmolalitas dan viskositas. Penambahan alginat dalam media TCK tidak memberikan pengaruh yang berarti pada perubahan pH. Nilai pH yang didapatkan masih berada pada kisaran optimal pH bagi spermatozoa, seperti yang dinyatakan oleh Contri et al. (2013) bahwa pada pH 7-7,5 spermatozoa menunjukkan karakter motilitas, viabilitas dan aktivitas mitokondrial yang tertinggi. Kelebihan dari penggunaan alginat sebagai media enkapsulasi diantaranya adalah alginat dapat bereaksi pada pH netral (Wang et al. 2006), sehingga pH yang dihasilkan aman bagi kehidupan sel termasuk sel spermatozoa. Sifat alginat yang mampu bereaksi pada pH netral memudahkan dalam aplikasi pembuatan media enkapsulasi spermatozoa yang memang memerlukan pH netral untuk menjamin kelangsungan hidup spermatozoa. Alginat tidak mengganggu bekerjanya sistem bufer pada pengencer TCK yang digunakan sebagai pengencer dasarnya, sehingga pH media tidak berbeda dengan pH pengencer TCK tanpa alginat yang digunakan sebagai kontrol positifnya.

Osmolalitas media enkapsulasi lebih tinggi dibandingkan dengan osmolalitas pengencer TCK tanpa alginat (Tabel 3). Osmolalitas menggambarkan banyaknya partikel terlarut dalam setiap liter larutan. Osmolalitas lingkungan akan berpengaruh terhadap tekanan osmotik sel dimana sel akan beradaptasi untuk mendapatkan kesetimbangan osmotik dengan lingkungannya. Hasil riset Liu & Foote (1998) menunjukkan bahwa osmolalitas media berpengaruh terhadap motilitas dan integritas membran spermatozoa, dimana spermatozoa lebih tahan terhadap media *hyperosmose* dibandingkan dengan kondisi *hypoosmose*.

Kekentalan atau viskositas media meningkat dengan meningkatnya konsentrasi alginat (Tabel 3), meningkatnya konsentrasi alginat dari 0, 1 ke 1,5% mengubah viskositas media yang sangat mencolok dari 1,12 menjadi 26,62 dan 47,98 cP. Batubara et al. (2012) mendapatkan nilai viskositas yang lebih rendah pada penggunaan alginat 1 dan 1,5% sebesar 17,6 dan

33,8 cP. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh perbedaan jenis alginat yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan *alginate high viscosity* sedangkan pada penelitian Batubara et al. (2012) tidak disebutkan tipe alginat yang digunakan. Dinyatakan oleh Goh et al. (2012) bahwa viskositas alginat selain ditentukan oleh konsentrasi alginat juga dipengaruhi oleh sumber, panjangnya monomer dan berat molekul alginat yang digunakan. Meningkatnya viskositas menyebabkan spermatozoa tampak bergerak semakin lambat dan berat, walaupun demikian spermatozoa tetap terlihat bergerak secara normal

Nebel et al. (1993) merekomendasikan penggunaan alginat 1-1,5% untuk mikroenkapsulasi spermatozoa dengan pertimbangan penggunaan alginat pada konsentrasi yang lebih rendah menghasilkan bentuk mikrogel yang tidak beraturan. Pada penelitian ini penggunaan alginat 1% masih menghasilkan mikrogel yang sebagian besar tidak beraturan bentuknya (Gambar 1A). Media enkapsulasi 1,5% alginat menghasilkan mikrogel dengan bentuk mikrokapsul yang bulat dengan diameter 1063 ± 630 (Gambar 1B).

Pengaruh alginat terhadap daya hidup spermatozoa

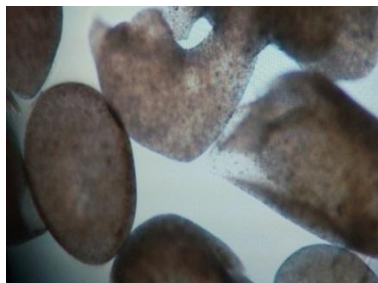
Pengaruh konsentrasi alginat terhadap daya hidup spermatozoa tersaji dalam Tabel 4. Penambahan alginat menurunkan motilitas spermatozoa ($P < 0,05$) bila dibandingkan dengan kontrol, namun dengan peningkatan konsentrasi alginat dari 1% menjadi 1,5% tidak menyebabkan perbedaan yang nyata. Penambahan alginat dalam media TCK tidak menyebabkan adanya perbedaan yang nyata terhadap H pada pengamatan 0 dan 1 jam, namun dengan meningkatnya waktu pengamatan maka H dalam media alginat lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol (Tabel 4). Penambahan alginat dalam media TCK tidak menghasilkan perbedaan yang nyata bagi nilai TAU. Secara umum viabilitas sperma menurun dengan bertambahnya waktu pengamatan baik pada media TCK yang mengandung alginat maupun tanpa alginat.

Keberadaan alginat dalam pengencer menyebabkan penurunan motilitas sekitar 5%. Penurunan motilitas terjadi karena adanya perbedaan lingkungan yang diindikasikan dengan adanya kondisi media hiperosmotik. Riset Liu & Foote (1998) yang melihat hubungan antara osmolalitas terhadap motilitas dan spermatozoa hidup menunjukkan, motilitas spermatozoa menurun ketika melewati kondisi fisiologis, baik pada kondisi hipoosmotik ataupun hiperosmotik. Selanjutnya Liu & Foote (1998) melaporkan adanya penurunan motilitas yang tajam terjadi ketika spermatozoa diekspose melebihi 500 mOsm, dan spermatozoa hidup menurun tajam saat diekspose pada 723 mOsm.

Tabel 3. Pengaruh alginat terhadap kondisi lingkungan pengencer TCK (5%) dan pergerakan spermatozoa

Aras alginat	pH	Osmolalitas	Viskositas (cP)	Gerakan spermatozoa
0%	7,01	275	1,1	Spermatozoa bergerak normal, progresif
1%	7,06	325	26,6	Spermatozoa bergerak normal, lebih lambat dan berat, progresif
1,5%	7,06	425	48,0	Spermatozoa bergerak normal, sangat lambat dan berat, progresif

Gerakan spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya, gerakan spermatozoa dalam media kontrol (0% alginat) digunakan sebagai pembanding, data disajikan secara diskriptif

**A****B****Gambar 1.** Mikrogel spermatozoa yang terbentuk dari media enkapsulasi yang mengandung 1% (A) dan 1,5% (B) alginat (perbesaran 40x)**Tabel 4.** Pengaruh alginat terhadap daya hidup spermatozoa yang diamati pada waktu inkubasi yang berbeda pada suhu ruang

Parameter	Inkubasi (jam)	Alginat (%)		
		0	1	1,5
M (%)	0	75,00 ^a ±5,00	70,00 ^b ±0,00	70,00 ^b ±0,00
	1	74,50 ^a ±4,47	70,00 ^b ±0,00	70,00 ^b ±0,00
	2	72,00 ^a ±4,47	67,00 ^b ±2,74	65,00 ^b ±0,00
	3	71,00 ^a ±4,47	67,00 ^b ±2,27	65,00 ^b ±0,00
H (%)	0	83,20 ^a ±6,46	80,40 ^a ±5,56	78,20 ^a ±10,83
	1	83,80 ^a ±6,46	80,00 ^a ±6,30	74,80 ^a ±10,99
	2	83,00 ^a ±4,30	78,80 ^b ±7,26	74,60 ^b ±4,98
	3	80,60 ^a ±4,50	78,20 ^b ±8,81	72,20 ^b ±9,36
TAU (%)	0	83,60 ^a ±7,73	82,20 ^a ±6,14	78,20 ^a ±4,60
	1	83,20 ^a ±8,82	82,00 ^a ±6,01	77,40 ^a ±5,17
	2	84,00 ^a ±8,30	78,40 ^a ±4,62	75,60 ^a ±3,81
	3	81,00 ^a ±10,62	75,20 ^a ±4,18	74,60±5,43 ^a

^{a,b} Huruf yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

M = Motilitas

H = Spermatozoa hidup

TAU = Tudung akrosom utuh

Dengan meningkatnya konsentrasi alginat dari 1 menjadi 1,5% terjadi peningkatan viskositas yang cukup tinggi (26,6 vs 48,0 pC) (Tabel 3) namun, tidak

berpengaruh nyata terhadap H maupun TAU (Tabel 4). Hal ini mungkin disebabkan tidak terdapatnya perbedaan tegangan antar lingkungan dengan jaringan

karena adanya pengaruh mekanik hidrogel. Menurut Uludag et al. (2000) mekanik hidrogel mampu mengurangi iritasi yang disebabkan oleh gesekan, bersifat lembut dan lentur, bersifat hidrofilik, sehingga menyebabkan tidak terdapat perbedaan tegangan antar lingkungan dengan jaringan. Pada pengamatan ini, respon kerusakan membran sel spermatozoa terhadap tingginya viskositas lebih rendah pada bagian akrosom dibandingkan dengan bagian yang lain yang ditunjukkan dari turunnya nilai H pada 2 dan 3 jam pengamatan ($P<0,05$), sedangkan nilai TAU tidak menunjukkan adanya penurunan yang nyata dibandingkan dengan kontrol di semua waktu pengamatan.

Penambahan alginat 1 dan 1,5% dalam media tidak berpengaruh nyata terhadap perubahan pH pengencer juga menjadi alasan mengapa tidak ditemukan adanya perbedaan yang nyata TAU. Bohlooli et al. (2012) menyatakan bahwa pengencer Tris mengandung komponen bufer yang mampu menjaga stabilitas pH, karenanya mampu mengelompokkan ion-ion hidrogen yang dihasilkan oleh metabolisme spermatozoa. Lebih lanjut dinyatakan bahwa penurunan pH akan menyebabkan spermatozoa kehilangan integritas membran yang berakibat pada penurunan fertilitas. Tidak dijumpai adanya penurunan pH yang berarti selama 3 jam pengamatan pada penelitian ini menunjukkan bahwa sistem bufer tidak terganggu dengan keberadaan alginat, sehingga tidak berpengaruh buruk terhadap TAU spermatozoa dalam media enkapsulasi.

Pengaruh konsentrasi alginat dan kuning telur terhadap daya hidup spermatozoa dalam media enkapsulasi

Pengamatan daya hidup spermatozoa dalam media enkapsulasi menunjukkan tidak dijumpai adanya pengaruh yang signifikan ($P<0,05$) dari interaksi antara konsentrasi kuning telur dengan alginat pada semua waktu inkubasi.

Setelah inkubasi lebih dari 1 jam pada suhu ruang maka motilitas alginat 1,5% menjadi lebih rendah

($P<0,05$) dibandingkan dengan alginat 1%. Apabila proses pembentukan enkapsulasi spermatozoa akan dilakukan menggunakan alginat 1,5%, maka prosesnya harus dikerjakan secepat mungkin sehingga tidak lebih dari 1 jam untuk menjaga agar motilitas yang dihasilkan tidak berbeda dengan alginat 1%. Penambahan kuning telur sebanyak 5-20% tidak berpengaruh nyata terhadap daya hidup spermatozoa dalam media enkapsulasi.

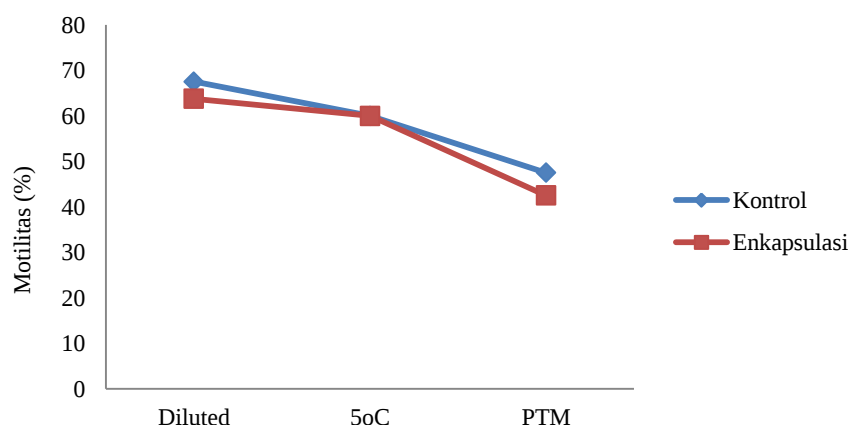
Pengencer TCK merupakan media yang sudah umum digunakan sebagai pengencer spermatozoa, media ini sangat baik dalam kemampuannya memelihara stabilitas pH disamping mampu memberikan nutrisi dan perlindungan yang diperlukan bagi spermatozoa untuk memelihara daya hidupnya. Kuning telur biasa ditambahkan dalam pengencer spermatozoa dari konsentrasi 2,5-20 % tergantung pada spesies ternak dan tujuannya aplikasinya. Situmorang (2003a; 2003b) menambahkan 5-10% kuning telur dalam pengencer semen untuk preservasi semen pada suhu 5 °C (*Chilled semen*), sedangkan untuk preservasi pada suhu yang lebih rendah menggunakan liquid nitrogen (-196 °C) penambahan kuning telur ditingkatkan menjadi 20%. Penambahan kuning telur selain dimaksudkan sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa juga untuk melindungi membran sel spermatozoa selama proses pendinginan (Eimen et al. 2014; Bispo et al. 2011).

Pembekuan spermatozoa terenkapsulasi menggunakan media 1,5% alginat dalam pengencer TCK 20% kuning telur menghasilkan *post thawing motility* (PTM) semen beku yang layak untuk diinseminasikan (SNI 2005) yaitu sebesar minimal 40%. Perbedaan kualitas spermatozoa yang terjadi pada proses pengenceran ($\pm 5\%$) menggunakan pengencer TCK 20% kuning telur yang mengandung alginat 1,5% alginat untuk semen enkapsulasi dan pengencer TCK 20% kuning telur dengan 0% alginat untuk semen kontrol berdampak pada PTM yang dihasilkan. Spermatozoa terenkapsulasi relatif lebih stabil selama masa penurunan suhu mencapai 5 °C, namun saat proses pembekuan spermatozoa terenkapsulasi menurun lebih tajam (Gambar 2).

Tabel 5. Pengaruh konsentrasi alginat dan kuning telur terhadap Motilitas (%) spermatozoa pada waktu inkubasi yang berbeda pada suhu ruang

Inkubasi (jam)	Kuning telur (%)				P	Alginat (%)		P
	5	10	15	20		1	1,5	
0	70,00 $\pm$ 0,00	70,00 $\pm$ 0,00	70,00 $\pm$ 0,00	70,00 $\pm$ 0,00	-	70,00 $\pm$ 00	70,00 $\pm$ 00	-
1	69,50 $\pm$ 1,12	69,50 $\pm$ 1,12	69,50 $\pm$ 1,12	69,50 $\pm$ 1,12	1,000	70,00 $\pm$ 00	69,00 $\pm$ 2,24	0,054
2	66,00 $\pm$ 1,37	65,00 $\pm$ 3,52	65,00 $\pm$ 3,17	65,00 $\pm$ 3,17	0,861	66,50 ^a $\pm$ 2,40	64,00 ^b $\pm$ 3,21	0,017
3	66,00 $\pm$ 1,37	66,00 $\pm$ 1,37	66,00 $\pm$ 1,37	65,00 $\pm$ 3,21	0,860	66,50 ^a $\pm$ 2,40	64,00 ^b $\pm$ 3,21	0,018

Tidak dijumpai pengaruh yang nyata pada interaksi kuning telur dengan alginat pada semua waktu inkubasi



Gambar 2. Pembekuan spermatozoa terenkapulasi (■) vs non enkapsulasi (◇)

Sukses proses pembekuan spermatozoa terenkapulasi memegang peranan penting yang akan membuka peluang aplikasi spermatozoa terenkapulasi dalam program IB di tingkat lapang. Proses kriopreservasi dan aplikasi IB semen terenkapulasi telah dilakukan di stasiun percobaan (data akan dipublikasikan).

Persentase hidup spermatozoa diamati menggunakan preparat eosin negrosin, dimana spermatozoa yang menyerap warna (pink-merah) adalah spermatozoa yang dinyatakan mati. Adanya penyerapan warna menunjukkan bahwa telah terjadi kerusakan pada membran yang menyebabkan kematian pada spermatozoa. Penambahan kuning telur dari level 5 sampai dengan 20% pada semua waktu pengamatan (Tabel 6 dan 7) ternyata tidak berpengaruh terhadap tingkat keutuhan membran spermatozoa yang tercermin sebagai persentase H dan TAU. Hal ini disebabkan karena pengamatan dilakukan pada suhu ruangan dimana efek perlindungan kuning telur adalah perlindungan terhadap stres selama penurunan suhu. Penambahan kuning telur dalam media pengencer spermatozoa selain dimaksudkan sebagai sumber nutrisi juga berperan untuk mencegah terjadinya stress dingin pada spermatozoa dengan adanya komponen lechitin dan phosfolipid dalam kuning telur. Hal ini dapat menjadi peluang untuk mendapatkan hasil mikroenkapsulasi yang lebih baik, yaitu dengan melakukan seluruh prosedur pembuatannya pada suhu rendah.

Dengan bertambahnya waktu inkubasi melebihi satu jam ternyata meningkatnya konsentrasi alginat selain menurunkan motilitas (Tabel 5) juga menyebabkan penurunan ($P < 0,05$) nilai TAU. Hal ini mungkin disebabkan karena spermatozoa terus bergerak kedepan

melawan viskositas yang tinggi, sehingga keutuhan membran akrosom menjadi menurun. Penurunan nilai TAU akan berdampak pada fertilitas sehingga penggunaan alginat dalam konsentrasi yang lebih tinggi (1,5%) harus memperhatikan kecepatan proses, dimana proses pembekuan mikrokapsul harus dilakukan dalam waktu kurang dari satu jam untuk menghindari menurunnya motilitas dan keutuhan membran akrosom.

Dari penelitian yang dilakukan dapat diketahui bahwa penambahan alginat dalam media TCK menyebabkan perubahan lingkungan media yang cukup mencolok namun begitu tidak menyebabkan pengaruh yang buruk bagi daya hidup spermatozoa. Media enkapsulasi yang mengandung 1% alginat belum menghasilkan bentuk mikrogel yang sesuai harapan, sehingga media 1,5% menjadi pilihan. Meningkatnya konsentrasi alginat dari 1 menjadi 1,5% membawa konsekuensi utama berupa kenaikan viskositas dan osmolalitas media, yang berpengaruh nyata terhadap motilitas dan TAU setelah satu jam inkubasi. Untuk menghindari penurunan motilitas dan TAU maka keseluruhan proses pembuatan mikroenkapsulasi spermatozoa harus selesai dalam waktu kurang dari satu jam. Selanjutnya spermatozoa terenkapulasi harus segera diawetkan melalui proses penurunan suhu untuk mengurangi aktivitas metabolik sperma. Peranan kuning telur menjadi penting selama proses penurunan suhu karena selain sebagai sumber nutrisi, kuning telur juga sebagai agen krioprotektan yang mampu melindungi membran spermatozoa dari stress karena proses pendinginan dan pembekuan. Kuning telur 5-20% dapat diaplikasikan sesuai dengan tujuan preservasi (semen dingin atau semen beku) mengingat daya hidup spermatozoa dalam media enkapsulasi tidak nyata dipengaruhi oleh perbedaan konsentrasi kuning telur.

Tabel 6. Pengaruh konsentrasi alginat dan kuning telur terhadap spermatozoa hidup (% H) pada waktu inkubasi yang berbeda pada suhu ruang

Inkubasi (jam)	Kuning telur (%)				P	Alginate (%)		P
	5	10	15	20		1	1,5	
0	79,30±8,18	79,10±4,52	80,80±2,74	81,00±5,23	0,858	80,80±4,48	79,30±6,63	0,449
1	76,80±9,12	77,50±7,24	76,90±10,59	78,00±6,33	0,987	78,10±6,78	76,50±8,82	0,555
2	77,30±5,65	75,90±6,03	77,20±6,84	77,90±7,97	0,938	78,45±7,37	75,70±6,38	0,239
3	75,70±9,08	75,40±8,22	73,90±11,37	78,50±7,70	0,744	77,45±7,44	77,45±7,44	0,298

Tidak dijumpai adanya interaksi yang nyata antara alginat dan kuning telur

Tabel 7. Pengaruh konsentrasi alginat dan kuning telur terhadap Tudung Akrosom Utuh (% TAU) pada waktu inkubasi yang berbeda pada suhu ruang

Inkubasi (jam)	Kuning telur (%)				P	Alginate (%)		P
	5	10	15	20		1	1,5	
0	80,20±5,90	79,70±5,22	77,60±6,29	75,50±7,60	0,362	79,55±5,67	76,95±7,19	0,213
1	80,30±5,94	80,30±5,94	77,60±5,88	75,90±10,27	0,631	80,00±7,37	75,45±8,39	0,531
2	77,00±3,99	77,90±6,50	76,50±7,48	73,50±10,09	0,598	78,80 ^a ±7,44	73,65 ^b ±7,43	0,039
3	77,80±4,60	76,30±4,44	75,40±9,14	71,60±12,26	0,392	77,60±7,07	72,95±9,09	0,083

Perbedaan nyata pada $P \leq 0,05$

Tidak dijumpai adanya interaksi yang nyata antara alginat dan kuning telur

KESIMPULAN

Penambahan alginat dalam pengencer TCK menghasilkan perubahan lingkungan (osmolalitas dan viskositas) pada media, walaupun tidak menyebabkan pengaruh buruk terhadap daya hidup spermatozoa.

Daya hidup spermatozoa masih tinggi untuk proses mikroenkapsulasi pada konsentrasi alginat 1-1,5%, namun bentuk mikrogel yang bulat baru terbentuk pada konsentrasi alginat 1,5%. Kuning telur dapat diaplikasikan pada konsentrasi 5-20%, sesuai dengan tujuan preservasinya. Kombinasi antara alginat 1,5% dengan 5-20% kuning telur optimal untuk digunakan sebagai media mikroenkapsulasi spermatozoa, karena pada konsentrasi 1,5% mikrogel sudah terbentuk dengan baik dan tidak ada masalah dalam aplikasi kuning telur pada konsentrasi tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada Badan Litbang Pertanian yang telah membiayai penelitian melalui Penelitian APBN /2012-2014/Balai Penelitian Ternak. Ucapan terima kasih juga disampaikan bagi rekan-rekan di Laboratorium Reproduksi dan Kandang Percobaan Ruminansia Besar yang telah membantu untuk terlaksananya kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Andianmanantoanina H, Rinaudo M. 2010. Characterization of alginates from five madagascan brown algae. *Carbohydr Polim.* 82:555-560.
- Batubara I, Rahayu D, Mohamad K, Prasetyaningtyas WE. 2012. Leydig cells encapsulation with alginate-chitosan: Optimization of microcapsule formation. *J Encapsulat Adsorb Sci.* 2:15-22.
- Bispo CAS, Pogliessi G, Galveo P, Rodrigues MT, Ker PG, Fulgueras B, Carvalho GR. 2011. Effect low and high concentration of egg yolk in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Rumin Res.* 100:54-58.
- Bohlooli S, Codden F, Jang JP, Razzaghzadeh S, Bozoglu S. 2012. The effect of different extenders on post-thaw sperm viability, motility and membrane integrity in cryopreserved semen of Zandi Ram. *J Basic Appl Sci Res.* 2:1120-1123.
- Contri A, Gloria A, Robbe D, Valerz C, Wegher L, Corluccio A. 2013. Kinetics study on the effect pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci.* 136:252-257.
- Draget KI, Taylor C. 2011. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll.* 25:251-256.
- de Vos P, Faas MM, Strand B, Calafiore R. 2006. Alginate base microcapsules for immunisolation of pancreatic islets. *Biomaterials.* 27:5603-5617.

- Eimen M, Aboagle E, Tenada T. 2014. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62:1160-1172.
- Goh CH, Heng PWS, Chan LW. 2012. Alginate as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic application. *Carbohydr Polim*. 88:1-12.
- Huang SY, Tu CF, Liu SH, Kue YH. 2005. Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 87:111-120.
- Kommisrud E, Hafmo PO, Klinkenberg B. 2012. Preservation and control delivery/release of spermatozoa. United States patent US. 2012 May 15.
- Kinasiewicz A. 2008. Electrostatic microencapsulation of living cells. *Biocyber Biomed Eng*. 28:69-84.
- Liu Z, Foote RH. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J Dairy Sci*. 81:1868-1873.
- Nebel RL, Bame JH, Saacke RG, Lim F. 1985. Microencapsulation of bovine spermatozoa. *J Anim Sci*. 60:1631-1639.
- Nebel RL, Vishwanath R, McMillan WH, Saacke RG. 1993. Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: A review. *Reprod Fertil Dev*. 5:701-712.
- Shah S, Nagano M, Yamashita Y, Hishinuma M. 2010. Microencapsulation of canine sperm and its preservation at 4°C. *Theriogenology*. 73:560-567.
- Shah S, Otsuki T, Fujimura C, Yamamoto N, Yamashita Y, Higaki S, Hishinuma M. 2011. Cryopreservation of microencapsulated canine sperm. *Theriogenology*. 75:679-686.
- Situmorang P. 2003a. The effect of inclusion of exogenous phospholipid in tris diluent containing different levels of egg yolk on viability of bull spermatozoa. *JITV*. 7:181-187.
- Situmorang P. 2003b. Prospek penggunaan semen dingin (*chilling semen*) dalam usaha meningkatkan produksi sapi perah. *Wartazoa*. 13:1-7.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan prosedur statistika*. Jakarta (Indonesia): PT Gramedia Utama.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia "Semen beku Sapi". 2005. Jakarta (Indonesia): Badan Standarisasi Nasional.
- Uludag H, De Vos P, Tresco PA. 2000. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev*. 42:29-64.
- Wang W, Liu X, Xie Y, Zhang H, Yu W, Xiong Y, Xie W, Ma X. 2006. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J Mater Chem*. 16:3252-3267.
- Watson PF. 1993. The potential impact of semen encapsulation technology on importance of timing of artificial insemination: a perspective in the light of published work. *Reprod Fertil Dev*. 691-699.