

Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Pola Kapasitasi dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Domba *In Vitro*

J. WATTIMENA

Jurusan Peternakan Fak. Pertanian Univ. Pattimura Ambon
Jl. Ir. M. Putuhena Poka-Ambon 97233, Tel. 0911-315984

(Diterima dewan redaksi 29 Juni 2006)

ABSTRACT

WATTIMENA, J. 2006. The effect of incubation time on capacitation and acrosome reaction of *in vitro* ovine spermatozoa. *JITV* 11(4): 295-301.

The aim of this research was to study the effect of incubation time on capacitation and acrosome reaction of *in vitro* ovine spermatozoa. Twelve ejaculates from two Garut sheep were collected using artificial vagina and then evaluated macro and microscopically. After semen washing (centrifugation method), semen was diluted in Brackett and Oliphant (BO) medium and then incubated during 6 hours in CO₂ incubator at 38.5°C. Evaluation of capacitation and acrosome reaction was conducted on 0 hour, 0.5 hour, 1 hour, 2 hours, 4 hours and 6 hours incubation time. The result showed that incubation time had significant ($P<0.05$) effect on no capacitation sperm (pattern F), capacitation (pattern B) and acrosome reaction (pattern AR). Incubation time had significantly ($P<0.01$) affect the subjective motility, life sperm and membrane integrity.

Key Words: Ovine Spermatozoa, Incubation, Capacitation, Acrosome Reaction, *In Vitro*

ABSTRAK

WATTIMENA, J. 2006. Pengaruh waktu inkubasi terhadap pola kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa domba *in vitro*. *JITV* 11(4): 295-301.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap pola kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa domba *in vitro*. Dua belas ejakulat semen ditampung dengan vagina buatan dari 2 ekor domba Garut jantan, kemudian dilakukan evaluasi makro dan mikroskopis. Setelah dilakukan pencucian semen (metode sentrifugasi) semen diencerkan dalam media Brackett and Oliphant (BO), diinkubasi di dalam incubator CO₂ selama 6 jam pada temperatur 38,5°C. Evaluasi pola kapasitasi dan reaksi akrosom dilakukan pada 0 jam, 0,5 jam, 1 jam, 2 jam, 4 jam dan 6 jam waktu inkubasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap spermatozoa belum kapasitasi (pola F), kapasitasi (pola B) dan reaksi akrosom (pola AR), demikian juga waktu inkubasi berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$) terhadap motilitas subyektif, spermatozoa hidup dan membran plasma utuh (MPU).

Kata kunci: Spermatozoa Domba, Inkubasi, Kapasitasi, Reaksi Akrosom, *In Vitro*

PENDAHULUAN

Setelah spermatozoa diproduksi di dalam tubulus seminiferus, maka spermatozoa akan mengalami 2 proses maturasi sebelum terjadi fertilisasi. Proses maturasi pertama terjadi di dalam epididimis dan maturasi kedua terjadi di dalam saluran reproduksi betina, yang disebut kapasitasi (*capacitation*). Proses kapasitasi ini meliputi kemampuan untuk motil atau bergerak, kemampuan untuk fertil dan penghilangan sitoplasma droplet (*cytoplasmic droplet*). Tanpa proses kapasitasi, spermatozoa tidak mampu untuk melakukan proses fertilisasi (BEARDEN dan FUQUAY, 2000).

Salah satu faktor pembatas utama dalam aplikasi teknologi fertilisasi *in vitro* adalah kapasitasi spermatozoa *in vitro* (KANAGAWA, *et al.*, 1989). Kapasitasi spermatozoa dimaksudkan untuk

menghilangkan faktor dekapasitasi (melindungi stabilitas membran plasma spermatozoa) yang terkandung di dalam plasma semen sehingga kapasitasi dan reaksi akrosom dapat terjadi. Akrosom spermatozoa domba mengandung *corona penetrating enzyme* (CPE) dan *trypsin like-enzyme* (TLE) yang sangat esensial untuk penetrasi zona pelusida. Adanya faktor dekapasitasi menghambat pengeluaran CPE yang secara langsung menghambat proses kapasitasi, reaksi akrosom dan fertilisasi (ROGERS dan BENTWOOD, 1982; KANAGAWA *et al.*, 1989).

Bahan aditif dalam media kapasitasi *in vitro* diperlukan untuk meningkatkan tingkat kapasitasi, reaksi akrosom dan fertilisasi. Bahan aditif dimaksud antara lain *bovine follicular fluid* (FUKUI *et al.*, 1983), *estrus sheep serum* (DE SMEDT *et al.*, 1992; LUNNAS *et al.*, 1996), *oviduct fluid* (PARRISH *et al.*, 1989), *bovine*

serum albumin (BSA) (DOW dan BAVISTER, 1989 disitasi GORDON, 1994). Kapasitas binding-protein (*albumin*) yang terkandung di dalam serum akan membantu kapasitas spermatozoa melalui pengurangan kolesterol membran spermatozoa (DE SMEDT *et al.*, 1992).

Spermatozoa kambing yang diinkubasi dalam media TALP yang disuplementasi dengan serum dan heparin, menunjukkan bahwa heparin menstimulasi fertilisasi *in vitro* dan meningkatkan efisiensi proses kapasitas (COX *et al.*, 1995). Menurut PARK *et al.* (1989) kafein dan heparin dalam media kapasitas bekerja secara sinergis mempercepat kapasitas dan reaksi akrosom. Hal yang sama dilaporkan oleh NIWA dan OHGODA (1988), bahwa 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ heparin dan 10 mM kafein dalam media kapasitas akan bekerja secara sinergis pada proses kapasitas spermatozoa beku (setelah *thawing*) melalui 2 kali pencucian dengan sentrifugasi selama 20 menit sebelum difertilisasi.

Secara *in vivo* waktu terjadinya kapasitas dalam saluran reproduksi domba betina antara 1-5 jam (DALE dan ELDER, 1997). Spermatozoa domba segar akan mengalami reaksi akrosom secara spontan setelah inkubasi selama 4 jam pada suhu 39°C dalam media tanpa bahan aditif. Menurut WATSON *et al.* disitasi SUKARDI *et al.* (1998) apabila media disuplementasi dengan *calcium ionophore* (A231187) maka 90% spermatozoa domba akan mengalami reaksi akrosom setelah diinkubasi selama 0,5 jam. Persentase spermatozoa sapi yang mengalami reaksi akrosom dalam media yang disuplementasi *follicular fluid* (FF) rendah pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami peningkatan setelah 4 jam diinkubasi (IQBAL dan HUNTER, 1995).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh waktu inkubasi terhadap pola kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa domba *in vitro*. Diharapkan hasil penelitian ini dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk digunakan dalam proses fertilisasi *in vitro* pada domba.

MATERI DAN METODE

Bahan dan media penelitian

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dari 2 ekor domba Garut jantan umur 2,5 tahun, dan dilakukan 2 hari sekali untuk setiap pejantan. Selanjutnya semen dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis sebelum digunakan sebagai sampel penelitian. Media yang dipakai untuk pencucian semen (*semen washing solution*/SWS) dan pengenceran semen (*semen dilution*

solution/SDS) adalah media Brackett and Oliphant (BO), *cafein benzoate* dan heparin.

Prosedur pencucian semen/*washing*

1. Semen segar hasil ejakulasi ditambahkan 8 mL media kapasitas/SWS untuk selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit pada 500 G (3 kali). Supernatan dibuang, kemudian konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *haemocytometer*.
2. Dua ratus μL semen yang telah dicuci (*washing*) ditambah 2 mL media pengencer/SDS. Enam ratus μL semen dimasukkan ke dalam *tube eppendorf* (1,5 mL) ditutup dengan *mineral oil* dan diinkubasi pada suhu 38,5°C selama 6 jam.
3. Evaluasi tingkat kapasitas dan reaksi akrosom dilakukan sesuai dengan perlakuan waktu inkubasi.

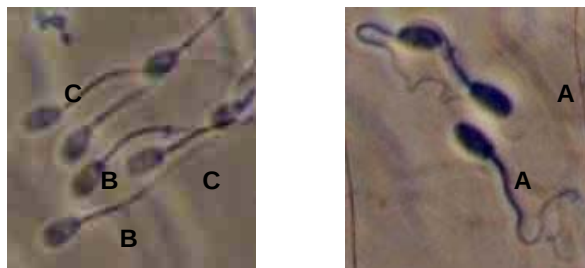
Evaluasi pola kapasitas dan reaksi akrosom

Evaluasi pola kapasitas dan reaksi akrosom dilakukan dengan metode pewarnaan CTC (*Chlortetracycline*) (FRAZER *et al.* disitasi WANG *et al.*, 1995; FULLER dan WHITTINGHAM, 1996). Prosedur pelaksanaannya sebagai berikut:

1. Spermatozoa hasil kapasitas *in vitro* (diinkubasi sesuai perlakuan) sebanyak 45 μL , dimasukkan pada tabung Eppendorf (1 mL) + 45 μL CTC dicampur selama 3 menit.
2. 8 μL (12,5%) *paraformaldehyde* dicampur dengan 0,5 mol tris HCl selama 3 menit.
3. 10 μL larutan tersebut diletakan pada kaca *slide* + larutan Dabco (*triethylenediamine*) lalu dicampur.
4. Tutup dengan cover glass dan pinggir *cover glass* ditutup dengan *nail varnish* (kuteks).
5. Preparat siap untuk diamati di bawah mikroskop *fluorescent*.

Pola kapasitas-reaksi akrosom spermatozoa dengan metode pewarnaan CTC digolongkan menjadi:

1. *Pola F*: seluruh kepala spermatozoa terwarnai oleh CTC, spermatozoa belum mengalami kapasitas.
2. *Pola B*: kepala spermatozoa pada bagian akrosom terwarnai oleh CTC, sedangkan bagian bawah bidang equator transparan, spermatozoa sudah mengalami kapasitas.
3. *Pola AR*: seluruh kepala spermatozoa tansparan kecuali pada bagian garis equator masih terwarnai sehingga tampak masih ada *band* pada garis tersebut, spermatozoa mengalami reaksi akrosom.



Gambar 1. Pola kapasitasi dan reaksi akrosom. (A) pola F; (B) pola B; (C) pola AR

Evaluasi keutuhan membran plasma (HOS-Test)

Evaluasi keutuhan membran plasma dilakukan dengan prosedur menurut JEYENDRAN *et al.* (1984) sebagai berikut:

1. Setengah mL larutan HOS (*hypoosmotic swelling test*) + 0,05 mL semen dalam *tube* (1,5 mL) diinkubasi selama 30 menit, suhu 38,5°C.
2. Satu tetes campuran semen dengan larutan HOS diletakkan pada gelas obyek dan ditutup dengan tutup gelas obyek.
3. Dihitung minimal sebanyak 200 kepala spermatozoa.
4. Spermatozoa dengan plasma membran utuh ekornya membengkok/melingkar, sebaliknya spermatozoa dengan plasma membran rusak ekornya lurus.

Metode penelitian dan analisis data

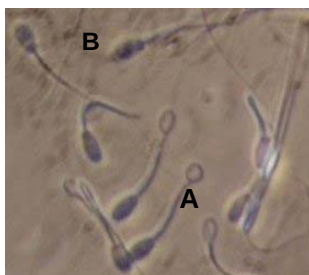
Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium terdiri dari 6 perlakuan waktu inkubasi yaitu 0, ½, 1, 2, 4 dan 6 jam. Evaluasi pola kapasitasi, reaksi akrosom dilakukan sesuai dengan perlakuan

waktu inkubasi. Setelah semen dikoleksi dilanjutkan dengan evaluasi kualitas dan kuantitas semen sebelum digunakan sebagai sampel penelitian yang meliputi volume, warna, bau, konsistensi, pH, gerakan masa, konsentrasi, motilitas, abnormalitas dan persentase hidup-mati spermatozoa. Sesudah sampel semen diberikan perlakuan peubah yang diamati meliputi tingkat kapasitasi dan reaksi akrosom (pola F, pola B dan pola AR), motilitas subyektif, keutuhan membran plasma, persentase hidup-mati spermatozoa. Analisis data dilakukan berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan jika terdapat pengaruh diuji dengan Uji Jarak Berganda Duncan's (GASPERSZ, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas dan kuantitas semen segar domba

Evaluasi kualitas dan kuantitas semen segar domba Garut dilakukan untuk menentukan layak tidaknya semen dijadikan sampel penelitian. Rataan kualitas dan kuantitas semen segar domba yang diperoleh dari 12 ejakulat dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 2. Keutuhan membran plasma spermatozoa. A. Membran plasma utuh. B. Membran plasma rusak

Tabel 1. Rataan kualitas dan kuantitas semen segar domba Garut

Karakteristik semen	Rataan
Makroskopik	
Volume (ml)	0,95 ± 0,05
Warna	Kream
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
pH	6,75 ± 0,27
Mikroskopik	
Gerakan masa	+++
Motilitas (%)	88,85 ± 2,35
Spermatozoa hidup (%)	90,59 ± 2,19
Konsentrasi (10 ⁹ ml ⁻¹)	2,99 ± 0,16
Abnormalitas (%)	9,10 ± 0,70

Data Tabel 1, menunjukkan bahwa volume semen domba 0,95±0,05 mL berada dalam kisaran yang dilaporkan oleh GARDNER dan HAFEZ (2000) yaitu 0,8-1,2 mL, dan ISMAYA (1993) yakni 0,5-1,34 mL untuk domba lokal. Warna semen domba kream, konsistensi kental dan bau khas sesuai dengan pendapat EVANS dan MAXWELL (1987). Semen domba umumnya berwarna putih dan kream terutama dengan konsentrasi spermatozoa tinggi. Warna kream disebabkan oleh adanya sekresi pigmen *riboflavin* oleh kelenjar vesikularis dengan konsistensi kental dan berbau khas. Menurut TOELIHERE (1985), bahwa untuk menilai gerakan masa, kualitas semen dikatakan sangat baik dengan tanda (++++) yaitu terlihat gerakan gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif berpindah-pindah dengan cepat. Derajat keasaman semen domba dalam penelitian ini adalah 6,75 ± 0,27 berada dalam kisaran yang dilaporkan GARDNER dan HAFEZ (2000) yakni 5,9-7,3.

Konsentrasi spermatozoa adalah 2,99±0,16x10⁹ per mL dan konsentrasi tersebut berada di bawah kisaran 3,5-6,0x10⁹ spermatozoa ml⁻¹ (EVANS dan MAXWELL, 1987), tetapi berada di atas kisaran domba lokal 33,32-46,26 x 10⁸ mL⁻¹ seperti dilaporkan oleh ISMAYA (1993). Motilitas 88,85±2,35% dan rataan spermatozoa hidup 90,59±2,19%. Menurut GARDNER dan HAFEZ (2000) motilitas spermatozoa domba bervariasi antara 60-80%, rata-rata 75% (BEARDEN dan FUQUAY, 2000), sedangkan menurut ISMAYA (1993), motilitas spermatozoa domba lokal 70,00-81,25%. Hasil penelitian motilitas spermatozoa 88,85±2,35% dan spermatozoa hidup 90,59±2,19% lebih tinggi daripada yang dilaporkan (Tabel 1).

Berdasarkan hasil evaluasi, maka kualitas semen domba penelitian dapat digunakan sebagai bahan perlakuan dalam penelitian ini karena berbagai karakteristik semen tersebut memenuhi persyaratan dan berada dalam kisaran normal.

Pola kapasitasi dan reaksi akrosom

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi berbeda nyata ($P<0,05$) terhadap spermatozoa belum kapasitasi (pola F), spermatozoa kapasitasi (pola B) dan reaksi akrosom (pola AR) (Gambar 1). Dari hasil penelitian (Tabel 2), nampak bahwa persentase spermatozoa belum kapasitasi (pola F) tertinggi pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami penurunan seiring dengan waktu inkubasi hingga mencapai persentase terendah pada 6 jam waktu inkubasi. Penurunan persentase spermatozoa belum kapasitasi (pola F) seiring waktu inkubasi dapat dipahami, karena setelah dilakukan pencucian (*washing*) *decapacitation factor* (DF) yang terkandung dalam plasma semen dan berfungsi melindungi sperma telah hilang sehingga proses kapasitasi dan reaksi akrosom dapat berlangsung dengan baik. Menurut KANAGAWA *et al.* (1989) kapasitasi spermatozoa bertujuan untuk menghilangkan faktor dekapasitasi (*decapacitation factor*/DF) yang terkandung di dalam plasma semen, dan diketahui melindungi stabilitas membran plasma spermatozoa. Akrosom spermatozoa domba mengandung *corona penetrating enzyme* (CPE) dan *trypsin like-enzyme* (TLE) yang sangat esensial untuk penetrasi zona pelusida. Adanya faktor dekapasitasi menghambat pengeluaran CPE dan secara langsung menghambat kapasitasi, reaksi akrosom dan fertilisasi.

Dari hasil penelitian nampak bahwa persentase spermatozoa kapasitasi (pola B) dan reaksi akrosom (pola AR) terendah pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami peningkatan seiring lama waktu inkubasi hingga mencapai persentase tertinggi pada 6 jam waktu inkubasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan WATSON *et al.* disitasi SUKARDI *et al.* (1998), bahwa spermatozoa domba segar akan mengalami reaksi akrosom secara spontan setelah inkubasi selama 4 jam pada suhu 39°C dalam media tanpa bahan aditif. SUKARDI *et al.* (1998) melaporkan bahwa 90% spermatozoa akan mengalami reaksi akrosom setelah diinkubasi 0,5 jam dalam media dengan *calcium ionophore* dan 75% spermatozoa akan mengalami reaksi akrosom (spermatozoa viabel) setelah diinkubasi selama 4 jam dalam media tanpa induker. Selanjutnya dikatakan bahwa 6 jam setelah diinkubasi terjadi peningkatan spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom (spermatozoa mati). Hal tersebut mengindikasikan bahwa terjadi pengurangan fungsi barier membran plasma.

Tabel 2. Pengaruh waktu inkubasi terhadap spermatozoa belum kapasitasi (Pola F), kapasitasi (Pola B) dan reaksi akrosom (Pola AR), motilitas subyektif, spermatozoa hidup dan keutuhan membran plasma (%)

Variabel	Waktu Inkubasi (jam)					
	0	0,5	1	2	4	6
Pola F (belum kapasitasi)	16,88 ^a	14,23 ^a	8,25 ^b	8,22 ^b	8,12 ^b	7,92 ^b
Pola B (kapasitasi)	83,12 ^a	85,77 ^a	91,75 ^b	91,78 ^b	91,88 ^b	91,08 ^b
Pola AR (reaksi akrosom)	13,86 ^a	14,62 ^a	34,31 ^b	56,44 ^c	68,50 ^d	78,25 ^e
Motilitas Subyektif*	91,67 ^a	84,67 ^b	77,91 ^c	67,92 ^d	55,83 ^c	40,00 ^f
Spermatozoa Hidup*	88,30 ^a	86,24 ^a	83,31 ^b	68,60 ^c	34,53 ^d	30,23 ^e
Membran Plasma Utuh*	85,00 ^a	81,85 ^b	78,24 ^c	71,11 ^d	40,49 ^c	34,39 ^f

Huruf yang berbeda pada baris menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)* Huruf yang berbeda pada baris menunjukkan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

Suplementasi *estrus sheep serum* (ESS) dalam media kapasitasi (BO) bertujuan untuk membantu kapasitasi spermatozoa domba (DE SMEDT *et al.*, 1992). Kapasitas *binding*-protein yang tinggi (*albumin*) yang terkandung dalam serum akan membantu kapasitasi spermatozoa melalui pengurangan kolesterol membran spermatozoa. Dikatakan juga oleh DOW dan BAVISTER disitasi GORDON (1994); LANGLAIS dan ROBERTH disitasi RODRIGUEZ dan KILLIAN (1998), bahwa albumin adalah asepor steroid yang memegang peran penting dalam pengeluaran kolesterol dan ion zinc dari membran plasma spermatozoa. Kedua molekul ini berfungsi menjaga kestabilan membran plasma spermatozoa. Menurut TAKASHI dan FIST (1993), selain menginduksi terjadinya proses kapasitasi pada spermatozoa sapi dan mencit, albumin sangat efektif meningkatkan motilitas spermatozoa.

Motilitas subyektif

Evaluasi motilitas spermatozoa dalam penelitian ini sulit dilakukan karena terjadi aglutinasi antar kepala spermatozoa mulai dari 2-6 spermatozoa sampai 10-20 spermatozoa. Kejadian serupa dilaporkan oleh DE SMEDT *et al.* (1992) bahwa *estrus sheep serum* (ESS) dalam media kapasitasi menyebabkan terjadinya aglutinasi antar kepala spermatozoa. Dikatakan pula akhir dari proses kapasitasi menyebabkan terjadinya peningkatan motilitas progresif spermatozoa dalam bentuk kelompok. Aglutinasi antar kepala spermatozoa merupakan salah satu indikasi terjadinya maturasi spermatozoa (HARAYAMA dan KATO, 2001). HARAYAMA *et al.* (1998) mengatakan bahwa spermatozoa akan mengalami aglutinasi satu dengan yang lainnya pada bagian akrosom saat diinkubasi, sehingga dapat disimpulkan bahwa aglutinasi spermatozoa merupakan manifestasi terjadinya kapasitasi. Faktor lain yang juga dapat menyebabkan

aglutinasi antar kepala spermatozoa adalah pencucian (*washing*) semen.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas subyektif. Data (Tabel 2) menunjukkan bahwa persentase motilitas subyektif tertinggi pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami penurunan seiring lama waktu inkubasi hingga mencapai persentase terendah pada 6 jam waktu inkubasi. Penurunan motilitas spermatozoa seiring dengan lama waktu inkubasi diduga karena spermatozoa kehabisan energi. Energi diperlukan oleh spermatozoa untuk aktif bergerak dan diperoleh dari penguraian ATP menjadi ADP dan AMP di dalam mitokondria yang berada di dalam ekor spermatozoa (HAFAZ, 1993; KING, 1993). Apabila ATP dan ADP habis maka kontraksi fibril dari ekor spermatozoa akan terhenti sehingga spermatozoa tidak bergerak. Untuk menjaga kesinambungan motilitas spermatozoa maka ATP dan ADP harus dibentuk lagi dalam bentuk reaksi bolak-balik (MATHEWS dan VAN HOLDE, 1996).

Spermatozoa hidup

SALISBURY dan VAN DEMARK (1985) mengatakan bahwa daya hidup spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa untuk tetap aktif bergerak setelah diinkubasi pada suhu yang lebih tinggi daripada suhu kamar atau setelah disimpan pada suhu yang lebih rendah.

Daya hidup spermatozoa *in vitro* dipengaruhi oleh kandungan zat yang terdapat dalam pengencer dan kualitas spermatozoa. Spermatozoa dengan kualitas baik mempunyai kemampuan untuk bertahan hidup lebih lama, karena memiliki kemampuan mengabsorpsi nutrisi lebih besar (KING, 1993). Spermatozoa dengan kualitas baik mempunyai *plasmalemma* dan *akrosoma* yang sempurna, sehingga mampu mengabsorpsi zat nutrisi yang disekresikan oleh sel sertoli, sedangkan

permeabilitas *plasmalemma* yang tinggi dibutuhkan untuk mempertahankan diri dari perubahan pH dan perubahan tekanan osmosis (LAMMING, 1990).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap spermatozoa hidup. Data (Tabel 2), menunjukkan bahwa persentase spermatozoa hidup tertinggi pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami penurunan seiring lama waktu inkubasi hingga mencapai persentase terendah pada 6 jam waktu inkubasi. Penurunan spermatozoa hidup disebabkan oleh berbagai faktor antara lain nutrisi, pH dan umur spermatozoa. Spermatozoa yang disimpan pada suhu kamar (37°C) daya hidupnya hanya beberapa jam. Hal tersebut disebabkan habisnya sumber nutrisi. Dikatakan pula bahwa penurunan pH diakibatkan terjadinya penimbunan asam laktat serta perubahan-perubahan yang terjadi karena umur spermatozoa berpengaruh terhadap daya hidup spermatozoa (TOELIHERE, 1985).

Membran Plasma Utuh (MPU)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inkubasi berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap membran plasma utuh. Data (Tabel 2), menunjukkan bahwa persentase membran plasma utuh tertinggi pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami penurunan seiring lama waktu inkubasi hingga mencapai persentase terendah pada 6 jam waktu inkubasi. Penurunan keutuhan membran plasma seiring dengan waktu inkubasi dipengaruhi oleh umur hidup spermatozoa dan kestabilan membran plasma. Rendahnya angka membran plasma utuh spermatozoa domba setelah diinkubasi selama 0-4 jam adalah karena rendahnya kemampuan spermatozoa untuk hidup pada suhu kamar 37°C (VALCARCEL *et al.*, 1994). AURICH *et al.* (1996), mengatakan bahwa komposisi plasma semen sangat berpengaruh terhadap kestabilan membran terutama kolesterol. Selama spermatozoa masih berada dalam plasma semen maka membran plasma spermatozoa tetap stabil, sebaliknya jika spermatozoa dipisahkan dari plasma semen maka membran plasma menjadi tidak stabil (YANAGIMACHI disitasi HAFEZ, 2000).

KESIMPULAN

Spermatozoa mengalami kapasitas setelah dicuci (*washing*) pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami peningkatan seiring waktu inkubasi, sedangkan reaksi akrosom mengalami peningkatan tertinggi pada 6 jam waktu inkubasi. Motilitas subyektif, spermatozoa hidup dan keutuhan membran plasma tertinggi pada 0 jam waktu inkubasi dan mengalami penurunan seiring lama waktu inkubasi hingga mencapai persentase terendah pada 6 jam waktu inkubasi. Berdasarkan hasil penelitian

disarankan pada proses fertilisasi *in vitro* waktu inkubasi spermatozoa dan oosit tidak lebih dari 6 jam. Hal ini disebabkan kapasitas dan reaksi akrosom masih terus mengalami peningkatan meskipun motilitas spermatozoa dan spermatozoa hidup mengalami penurunan secara drastis setelah 4 jam diinkubasi.

DAFTAR PUSTAKA

- AURICH, J.E., A. KUHNE, H. HOPPE and C. AURICH. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*. 41: 791-797.
- BEARDEN, H.J. and J.W. FUQUAY, 2000. Applied Animal Reproduction. 5th Ed. Prentice Hall. New Jersey.
- COX, J.F., F. SARAVIA, M. BRIONES and A.S. MARIA. 1995. Dose dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 40: 451-460.
- DALE, B. and K. ELDER. 1997. *In Vitro Fertilization*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- DESMEDT, V., N. CROZET, M.A. ALI, A. MARTINO and Y. CONIE. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*. 37: 1049-1060.
- EVANS, G. and W.M.C. MAXWELL. 1987. Artificial Insemination of Sheep and Goat. Butterworths, Sidney.
- FULLER, S.J. and D.G. WHITTINGHAM. 1996. Effect of cooling mouse spermatozoa to 4°C on fertilization and embryonic development. *J. Reprod. Fertil.* 108: 149-145.
- FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA and H. ONO. 1983. Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology*. 20: 651-660.
- GARDNER, D.L. and E.S.E. HAFEZ. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: E.S.E. HAFEZ. Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- GASPERSZ, V. 1994. Metode Perancangan Percobaan. Armico. Bandung.
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Ireland.
- HAFEZ, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- HAFEZ, E.S.E. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- HARAYAMA, H. and S. KATO. 2001. Factors regulating changes of head-to-head agglutinability in boar spermatozoa during epididymal transit and capacitation in vitro. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14: 1196-1202.
- HARAYAMA, H., M. MIYAKE, O. SHIDARA, E. IWAMOTO and S. KATO. 1998. Effects of calcium and bicarbonate on head-to-head agglutinin in ejaculated boar spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 445-450.

- IQBAL, N and A.G. HUNTER. 1995. Comparison of various bovine sperm capacitation system for their ability to alter the net negative surface charge of spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 78: 84-90.
- ISMAYA. 1993. Hubungan antara besar scrotum dengan volume semen, motilitas dan konsentrasi spermatozoa pada domba lokal. *Buletin Peternakan* 17: 34-37.
- JEYENDRAN, R.S., H.H. VAN DER HEN, M.P. PALAEZ, B.G. CRABO and L.J.D. ZANEVELD. 1984. Development of and assay to asses the functional integrity of the human sperm membran and its relationship to the other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-225.
- KANAGAWA, H., O.A. MAZNI and C.A. VALDEZ. 1989. Oocyte Maturation and in Vitro Fertilization in Farm Animals. Biotechnology for Livestock Production. FAO. Roma. pp. 79-95.
- KING, C.J. 1993. Reproduction in Domesticated Animals. Elsevier Science Publisher. New York.
- LAMMING, G.E. 1990. Marshall's Physiology of Reproduction. Reproduction in the Animal. Vol. 2. Churchil Livingstone. New York.
- LUNNAS, E.M., A. MARTINO, M.T. PARAMIO, M.J. PALOMO, M.T. MOGAS, M.A. BIELSA, P. ANDOLZ and P. MARTINEZ. 1996. Effect of oocyte-sperm co-incubation on acrosome reaction in the goat. *Theriogenology*. 48: 321-330.
- MATHEWS, C.K. and K.E. VAN HOLDE. 1996. Biochemistry. The Benjamin-Cummings Publishing Company, Inc. California. New York.
- NIWA, K. and O. OHGODA. 1988. Synergic effect of caffeine and heparine on in vitro fertilization of cattle oocyte matured in culture. *Theriogenology*. 30: 733-741.
- PARK, C.K., O. OHGODA and K. NIWA. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fertil.* 86: 577-582.
- PARRISH, J.J., J.L. PARRISH, R.R. HANDOW, M.M. SINS and N.L. FIST. 1989. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol. Reprod.* 40: 1020-1025.
- RODRIGUEZ, C. and G. KILLIAN, 1998. Identification of ampullary and isthmic oviductal fluid proteins that associate with the bovine sperm membran. *J. Anim. Reprod. Sci.* 54: 1-12.
- ROGERS, B.J. and B.J. BENTWOOD. 1982. Capacitation, Acrosome Reaction and Fertilization. In: L.J.D. Zaneveld and R.T. Charteron. Biochemistry of Mammalian Reproduction. John Willey and Sons. New York.
- SALISBURY G.W. dan N.L. VAN DEMARK. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Terjemahan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- SUKARDI, S., M.R. CURRY and P.F. WATSON. 1998. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using flourescent markers. *J. Anim. Reprod. Sci.* 46: 89-96.
- TAKASHI, Y. and N.L. FIST. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryo; influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*. 44: 963-978.
- TOELIHERE, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. C.V. Angkasa. Bandung.
- VARCALCEL, A., M.A. DE LAS HERAS, L. PERES, D.F. MOSES and H. BALDASSARE. 1994. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology*. 46: 483-489.
- WANG, W.H., L.R. ABEYDEERA, L.R. FRAZER and K. NIWA. 1995. Functional analysis using chlortetracycline flourescence and in vitro fertilization of frozen-thawed ejaculated boar spermatozoa incubated in a protein-free chemically defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 104: 305-313.