

KAJI BANDING MORFOMETRI SPERMATOZOA SAPI BALI (*Bos sondaicus*) MENGUNAKAN PEWARNAAN WILLIAMS, EOSIN, EOSIN NIGROSIN DAN FORMOL-SALINE

COMPARATIVE STUDY OF BALI BULL CATTLE (*Bos sondaicus*) SPERM MORPHOMETRY USING WILLIAMS, EOSIN, EOSIN NIGROSIN STAIN AND FORMOL-SALINE

RI Arifiantini, T Wresdiyati dan EF Retnani

Fakultas Kedokteran Hewan-Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkaji morfometri spermatozoa sapi bali dengan pewarnaan Williams (W), eosin (E), eosin nigrosin (EN) dan fiksasi *formol-saline* (FS) sebagai data dasar yang sampai saat ini belum dilaporkan. Semen dikoleksi dengan teknik vagina buatan dari sepuluh ekor sapi di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Baturiti, Bali. Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Morfometri spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikrometer dengan bagian yang diukur adalah panjang dan lebar kepala; panjang ekor bagian tengah dan utama; serta panjang total sperma pada 50 sel untuk setiap sampel sebanyak 3 ulangan. Morfometri spermatozoa pada bagian panjang kepala dengan pewarnaan W ($10,05 \pm 0,05 \mu\text{m}$) dan FS ($10,08 \pm 0,04 \mu\text{m}$) nyata lebih panjang ($P < 0,05$) dibandingkan E ($9,94 \pm 0,06 \mu\text{m}$) dan EN ($9,98 \pm 0,04 \mu\text{m}$). Tidak ada perbedaan pada lebar kepala dengan rata-rata $4,96 \pm 0,05 \mu\text{m}$. Pada panjang bagian tengah ekor tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dari keempat pewarnaan dengan rata-rata $12,97 \pm 0,08 \mu\text{m}$. Pada bagian utama ekor pewarnaan W tidak menunjukkan perbedaan dengan E, demikian juga E dengan FS. Panjang bagian utama ekor pada pewarnaan EN ($12,92 \pm 0,09 \mu\text{m}$) menunjukkan perbedaan yang nyata lebih pendek ($P < 0,05$) dibandingkan W, E dan FS. Kesimpulan dari penelitian ini adalah teknik pewarnaan yang digunakan dalam pengukuran morfometri spermatozoa memberikan pengaruh nyata pada ukuran panjang kepala dan ekor bagian utama tetapi tidak pada lebar dan panjang ekor bagian tengah.

Kata kunci: Morfometri, spermatozoa, sapi Bali

ABSTRACT

The objectives of this research were to compare the sperm morphometry of bali bull cattle using Williams (W), eosin (E), eosin nigrosin (EN) staining technique and formol-saline fixation. The semen were collected from ten bali bull cattle using artificial vagina and then evaluated macro and microscopically. Morphometry of spermatozoa was conducted by using micrometer, the length and width of sperm head and the length of the tail were measured on 50 cells for each bull with three replication. Morphometry in sperm head length using W staining ($10.05 \pm 0.05 \mu\text{m}$) and FS was ($10.08 \pm 0.04 \mu\text{m}$) significantly longer ($P < 0.05$) than E staining ($9.94 \pm 0.06 \mu\text{m}$) and EN staining ($9.98 \pm 0.04 \mu\text{m}$). There was no significantly different in head width and midpiece $4.96 \pm 0.05 \mu\text{m}$ and $12.97 \pm 0.08 \mu\text{m}$ respectively. The principle piece of W staining was no significantly different with E staining, as well as E and FS. The principle piece of tail with EN staining ($12.92 \pm 0.09 \mu\text{m}$) significantly shorter ($P < 0.05$) than W, N and FS. This is indicate that influence of staining technique for morphometry spermatozoa are significantly different for head lenght and mid piece lenght but not for head width and principle length.

Key words: Morphometry, spermatozoa, Bali bull-cattle

PENDAHULUAN

Morfologi Spermatozoa terbagi atas bagian kepala dan ekor (Hafez & Hafez, 2000). Kepala spermatozoa dibagi menjadi dua daerah yaitu daerah akrosom anterior yang dibungkus oleh tudung akrosom dan daerah *post* akrosomal posterior. Tudung akrosom berasal dari aparatus golgi selama tahap awal *spermiogenesis*. Tudung akrosom mengandung akrosin, *hyaluronidase*, dan enzim-enzim hidrolitik lainnya yang terlibat pada proses fertilisasi. Barth dan Oko (1989) menyatakan bahwa ekor sperma terbagi atas tiga bagian yaitu bagian tengah (*midpiece*), bagian utama (*principal piece*) dan bagian ujung (*endpiece*). Bagian tengah spermatozoa adalah bagian yang dimulai dari *distal* bagian penghubung sampai *annulus* yaitu suatu struktur yang membentuk batas antara bagian tengah dengan bagian utama. Bagian utama ekor sperma merupakan bagian yang dimulai dari *annulus* sampai ke bagian ujung sedangkan bagian ujung ekor merupakan bagian akhir dari aksonema yang meruncing sempurna (Mortimer, 1997).

Morfometri merupakan ukuran-ukuran dari spermatozoa yang masih jarang dilaporkan. Pengkajian terhadap morfometri spermatozoa perlu dilakukan untuk mengetahui karakteristik ukuran-ukuran spermatozoa pada berbagai hewan (Gizejewski *et al.*, 2002). Selain itu pengetahuan terhadap morfometri spermatozoa diperlukan untuk pengkajian terhadap upaya kriopreservasi semen mengingat terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ukuran spermatozoa semen segar dengan semen yang telah mengalami kriopreservasi (Arruda *et al.*, 2002).

Pemilihan empat macam pewarnaan dengan fiksasi yang berbeda sengaja diambil untuk mengkaji seberapa jauh perbedaan ukuran yang didapat jika fiksasi dan pewarnaan dilakukan di lapang (eosin dan eosin nigrosin), fiksasi dilakukan di lapangan sedangkan pewarnaan dilakukan di laboratorium (Williams) serta fiksasi basah (*formol-saline*) mengingat adanya kekhawatiran jika fiksasi dan pewarnaan dilakukan di lapang, tetapi observasi morfometri dilakukan pada waktu

yang berbeda akan terjadi kemungkinan dehidrasi atau rehidrasi sehingga akan mempengaruhi ukuran-ukuran spermatozoa yang sebenarnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan morfometri spermatozoa sapi bali menggunakan pewarnaan Williams, eosin, eosin nigrosin dan *formol-saline*.

MATERI DAN METODE

Sampel diambil dari sepuluh ekor sapi bali jantan dewasa kelamin yang terdapat di UPTD Baturiti, Bali. Pengamatan dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR) dan Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, dilaksanakan dari bulan Februari sampai Juli 2005.

Penampungan semen. Penampungan semen dilakukan secara kontinu pada periode musim yang sama dengan menggunakan vagina buatan (Sorenson, 1979) Semen yang dikoleksi kemudian dibuat sediaan untuk pewarnaan.

Pembuatan sediaan untuk morfologi dan morfometri.

Pewarna Williams. Semen segar yang dikoleksi dilarutkan dengan NaCl fisiologis satu banding empat, lalu dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek dan dikeringudarkan. Sampel disimpan pada boks preparat dan pewarnaan dilakukan di URR. Pewarnaan dilakukan di Bogor dengan cara memfiksasi prerapat ulas dari semen segar yang dikoleksi di Bali di atas api bunsen dan selanjutnya dicuci dalam alkohol *absolute* selama 4 menit lalu dikeringudarkan. Preparat dimasukkan kedalam larutan 0.5% *chloramin* selama 1-2 menit, sambil diangkat dan dimasukkan kembali berkali-kali dengan tujuan menghilangkan mukus dan ulasan terlihat jernih. Kemudian dicuci dalam *distilled water*, selanjutnya dalam alkohol 95% dan diwarnai dengan larutan Williams selama 8-10 menit. Kemudian dicuci pada air mengalir dan dikeringkan (Anonimus 2004).

Pewarnaan Eosin. Eosin yang digunakan adalah eosin 2% yaitu eosin *bluish* 2 g dalam 100 ml sodium sitrat 2,9% (Toelihere, 1993). Semen segar dicampur dengan eosin 2% (Toelihere, 1993) satu berbanding empat selanjutnya di buat preparat ulas tipis dan dikeringkan di atas meja pemanas (*heating table*).

Pewarnaan Eosin nigrosin. Larutan pewarna eosin nigrosin terdiri dari nigrosin 20,0 g dan sodium sitrat 1,5 gram dalam 300 ml *distilated water*, *distirrer* dan dihangatkan sampai larut, ditambahkan eosin *Yellow* 3,3 gram ke dalam larutan nigrosin, pH disesuaikan sampai 6,8-7,0. Larutan dibiarkan beberapa hari dan disaring sebelum digunakan (Barth dan Oko, 1989). Preparat ulas dibuat dengan cara mencampur semen segar dengan eosin nigrosin satu berbanding empat selanjutnya dibuat preparat ulas tipis dan dikeringkan di atas meja pemanas (*heating table*).

Formol-saline (Anonim, 2004). Larutan *formol saline* terdiri atas 6,19 gram *di-sodium hydrogen phosphate dehydrate*, 5,41 gram *sodium chloride*, 2,54 gram *potassium di-hydrogen phosphate*, 125 ml *formaldehyde solution* (37%) dan 875 ml aquades. Fiksasi dilakukan dengan melarutkan 10 µl semen segar dalam 1 ml larutan *formol-saline* selanjutnya dihomogenkan.

Morfometri spermatozoa. Pengukuran morfometri dengan pewarnaan eosin, eosin nigrosin dan Williams dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 10 x 100 yang di atas preparat diberi mikrometer berskala. Sedangkan pengamatan morfometri pada fiksasi *formol-saline* dilakukan dengan menggunakan mikroskop fase kontras pada perbesaran 10 x

20 dengan mikrometer. Karakteristik morfometri meliputi panjang kepala, lebar kepala, panjang ekor bagian tengah, panjang ekor utama dan panjang total sperma dari 50 spermatozoa per sampel. Pengukuran morfometri hanya dilakukan pada ekor sperma yang lurus.

Analisis data. Pengamatan morfometri spermatozoa dilakukan dengan tiga kali ulangan. Data yang diperoleh dari hasil evaluasi semen segar dicari rata-rata dan simpangan bakunya, sedangkan pengamatan morfometri dengan berbagai teknik pewarnaan diolah dengan menggunakan uji parametris Rancangan Acak Lengkap (RAL) (Walpole 1995)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan morfometri spermatozoa dapat dilakukan dengan bantuan mikroskop cahaya atau mikroskop fase kontras, tergantung pewarnaan yang digunakan (Gambar 1 dan 2). Metode terbaru untuk mengamati spermatozoa adalah *Automated Sperm Morphometry Analysis* (ASMA) di mana dengan metode ini diperoleh hasil yang lebih akurat dan mudah dikerjakan. Metode ini belum banyak dilakukan karena peralatan yang cukup mahal (Gravance *et al.*, 1995). Metode pewarnaan spermatozoa yang dilakukan dalam pengamatan morfometri spermatozoa banyak diperdebatkan (Arruda *et al.*, 2002; Gravance *et al.*, 1995) hal ini disebabkan karena muncul dugaan bergesernya ukuran spermatozoa akibat dehidrasi atau rehidrasi karena pengaruh zat warna atau fiksator yang digunakan (Gunarso 1989).

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, terlihat bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara panjang kepala dan panjang



Gambar 1. Bagian-bagian spermatozoa yang diukur

Tabel 1. Rataan morfometri spermatozoa sapi Bali dengan pewarnaan Williams, eosin, eosin nigrosin dan *formol-saline*

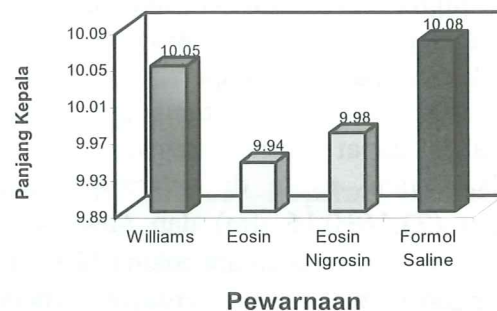
Pewarnaan	Kepala		Ekor		Panjang Total
	Panjang	Lebar	Tengah	Utama	
Williams (μm)	10.05 \pm 0.05a	4.98 \pm 0.06 a	12.98 \pm 0.08 a	50.15 \pm 0.14 a	73.16 \pm 0.16 a
Eosin (μm)	9.94 \pm 0.06b	4.96 \pm 0.04 a	12.96 \pm 0.04 a	50.01 \pm 0.14ab	72.87 \pm 0.16 b
Eosin nigrosin (μm)	9.98 \pm 0.04b	4.92 \pm 0.04 a	12.92 \pm 0.09 a	49.39 \pm 0.29 c	72.17 \pm 0.25 c
Formol saline (μm)	10.08 \pm 0.04a	4.97 \pm 0.06 a	13.01 \pm 0.11 a	49.92 \pm 0.18 b	73.00 \pm 0.26 ab
Rata-rata (μm)	10.01 \pm 0.05	4.96 \pm 0.05	12.97 \pm 0.08	49.88 \pm 0.19	72,83 \pm 0.21

Keterangan : nilai yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada taraf ($P>0,05$)

bagian utama ekor (Tabel 1) tetapi tidak pada lebar kepala ($4,96\pm 0,05 \mu\text{m}$) dan ekor bagian tengah ($12,97\pm 0,08 \mu\text{m}$). Panjang kepala dengan pewarnaan Williams ($10,05\pm 0,05 \mu\text{m}$) dan *formol-saline* ($10,08\pm 0,04 \mu\text{m}$) menunjukkan nyata lebih panjang ($P<0,05$) dibandingkan eosin ($9,94\pm 0,06 \mu\text{m}$) dan eosin nigrosin ($9,98\pm 0,04 \mu\text{m}$) (Gambar 3 dan 4). Hal ini diduga akibat pengaruh preparasi preparat yang kurang tepat. Penggunaan zat warna eosin dan eosin nigrosin dengan pemanasan pada *heating table* pada suhu 37°C menyebabkan preparat lambat kering dan terjadi pemaparan zat warna yang terlalu lama yang menyebabkan perubahan bentuk pada spermatozoa sehingga terjadi pergeseran ukuran yang pada dasarnya tidak terlalu besar. Penggunaan gelas obyek yang dingin dalam preparasi juga menyebabkan spermatozoa mengalami *shock* suhu sehingga dapat terjadi pengkerutan ukuran sebelum fiksasi dilakukan. Dalam hal ini perlu dilakukan pengkajian terhadap suhu optimal untuk fiksasi dan

pewarnaan.

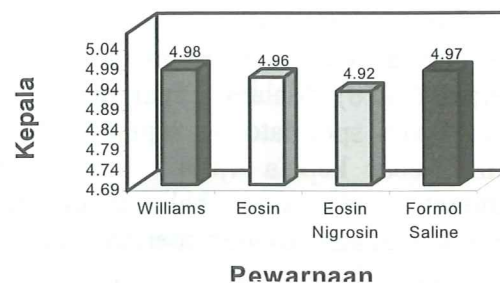
Pada ekor bagian utama, pewarnaan Williams ($50,15\pm 0,14 \mu\text{m}$) tidak menunjukkan perbedaan dengan eosin ($50,01\pm 0,14 \mu\text{m}$), demikian juga eosin dengan *formol-saline* ($49,92\pm 0,18 \mu\text{m}$). Panjang bagian utama ekor pada pewarnaan EN ($12,92\pm 0,09\mu\text{m}$) menunjukkan perbedaan yang nyata lebih pendek ($P<0,05$) dibandingkan dengan



Gambar 3. Perbandingan ukuran panjang kepala spermatozoa menggunakan berbagai pewarnaan



Gambar 2. Spermatozoa sapi Bali dengan pewarnaan eosin



Gambar 4. Perbandingan ukuran lebar kepala spermatozoa menggunakan berbagai pewarnaan

Tabel 2 Perbandingan morfometri spermatozoa dari beberapa ternak

Parameter	Kerbau			Sapi ⁽³⁾	Kuda	
	Rawa ⁽¹⁾	Belang ⁽²⁾	Murrah ⁽²⁾		Lokal ⁽⁴⁾	Luar ⁽⁵⁾
Panjang Kepala (µm)	7,81±0,43	7,4-8	7,40	12,0±0,5	3,82 ± 0,46	4,9-10,6
Lebar Kepala (µm)	4,14±0,47	4,48-5,30	4,48	6,0±0,7	1,82 ± 0,28	2,5-3,91
Ekor Tengah (µm)	12,6±0,13		12,41		5,63 ± 0,69	10,5-12,7
Ekor Utama (µm)	40,4±1,95		43,61			27,9
Ekor Total (µm)	53,0		66,02		22,27 ± 1,9	38,4-40,6
Panjang Total (µm)	64,94±1,59	54,53-70,10	73,42	81,0±2,5	31,72 ± 3,07	43,3-51,2

Arifiantini dan Ferdian (2004)⁽¹⁾; Batosamma (1985)⁽²⁾; Ondho (1985)⁽³⁾; Arifiantini dkk⁽⁴⁾ (2005); Morel (1999)⁽⁵⁾

Williams, eosin dan *formol-saline* (Tabel 1). Perbedaan ukuran pada ekor bagian utama dapat terjadi karena terdapat variasi ukuran dari pendek sampai panjang. Jadi perbedaan ukuran sperma tidak dapat ditentukan hanya dari ukuran panjang ekor utama. Tingkat ketelitian dari mata pengamat juga menentukan hasil pengukuran ini. Makin ke ujung (*end piece*), ekor akan menipis dan harus lebih teliti dalam memainkan *focus* mikroskop sehingga kemungkinan *human error* juga dapat terjadi dalam pengukuran bagian ekor utama.

Panjang total merupakan hasil penjumlahan panjang kepala, ekor bagian tengah dan ekor bagian utama spermatozoa. Dari tabel dapat dilihat bahwa tidak ada perbedaan yang nyata di antara pewarnaan Williams (73,16±0,16 µm) dan *formol-saline* (73,00±0,26 µm) serta antara eosin (72,87±0,16 µm) dengan *formol-saline*. Terdapat perbedaan yang nyata ukuran panjang total pada pewarnaan eosin nigrosin (72,17±0,25 µm). Hal ini terjadi akibat variasi panjang ekor bagian utama pada penghitungan yang menyebabkan variasi panjang total spermatozoa.

Ukuran-ukuran sperma tersebut dalam kisaran normal karena menurut Rajwar dan Mukherjee (1970) "dalam" Toelihere (1993) panjang kepala spermatozoa sapi adalah 8,0-10,0 µm, lebar kepala 4,0-4,5 µm. Ukuran spermatozoa pada sapi bali lebih besar dibandingkan dengan ukuran sperma pada kuda (Morel, 1999); kerbau rawa (Arifiantini dan Ferdian, 2004); kerbau belang (Batosama, 1985) dan pada kerbau murrah (Ondho, 1985). Penelitian yang dilakukan Arifiantini dkk (2005) terhadap kuda lokal Indonesia juga

melaporkan bahwa ukuran spermatozoa asal cauda epididimis lebih kecil dari sapi bali (Tabel 2).

Morfometri spermatozoa pada bagian panjang kepala dengan pewarnaan Williams, eosin, eosin nigrosin dan *formol-saline* secara berturut-turut adalah 10,05±0,05 µm, 9,94±0,06 µm, 9,98±0,04 µm, dan 10,08±0,04 µm. Rata-rata ukuran lebar kepala dan panjang *mid piece* adalah 4,96±0,05 µm dan 12,97±0,08 µm. Sedangkan bagian utama ekor dengan pewarnaan Williams 50,15±0,14 µm, eosin 50,01±0,14 µm, eosin nigrosin 12,92±0,09 µm dan *formol-saline* 49,92±0,18 µm. Teknik pewarnaan yang digunakan dalam pengukuran morfometri spermatozoa memberikan pengaruh nyata pada ukuran panjang kepala dan ekor bagian utama tetapi tidak pada lebar dan panjang ekor bagian tengah.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Pimpinan dan seluruh staf Unit Pelaksana Teknis (UPTD) Baturiti, Bali dan drh. Kusdiantoro Muhamad, M.S. untuk fasilitas dan koleksi data. Untuk Prof. Dr. Mozes R. Toelihere, M.Sc. (alm) untuk bimbingan, dukungan dan kepercayaannya selama ini.

DAFTAR PUSTAKA

Anonimus 2004. Materi pelatihan Diagnostic spermatology" Di SLU Upsala, Swedia (1-30 November).

- Arifiantini, R.I., Ferdian F. 2004. Tinjauan Aspek Morfologi dan Morfometri Spermatozoa Kerbau Rawa (*Bubalus bubalis*) yang Dikoleksi Dengan Teknik Masase. Makalah Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner di Bogor tanggal 4-5 Agustus 2004.
- Arifiantini, R.I., Pane, R., Yusuf, T.L., Purwantara, B. dan Toelihere, M.R. 2005. Karakteristik Anatomi Organ Reproduksi serta Konsentrasi dan Morfometri Spermatozoa Asal Cauda Epididymis pada Kuda Jantan Lokal. (belum dipublikasikan).
- Arruda, R.P., Ball, B.A., Gravance, C.G., Garcia, A.R., IKM, Liv. 2002. Effect of Extender and Cryoprotectants on Stallion Sperm Head Morphometry. *Theriogenology* 58 : 253 – 256.
- Barth, A.D. and Oko, R.J. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa: Iowa State University Press.
- Batosamma, J.T. 1985. Penerapan Teknologi Inseminasi Buatan untuk Pelestarian Sumberdaya Ternak Kerbau Belang [disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Gizejewski, Z., Marta, W., Jolanta, P. 2002. Seasonal Changes in The Dimensions of Red Deer (*Cervus elaphus*) Spermatozoa. *M Polish Academy of Sciences*. Research Station for Ecological Agriculture and Preserve Animal Breeding. Poland.
- Gravance, C.G., Lewis, K.M., Casey, P.J. 1995. Computer Automated Sperm Head Morphometry Analysis (ASMA) of Goat Spermatozoa. *Jurnal Andrologi* 16:18-93.
- Gunarso, W. 1989. *Mikroteknik*. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hafez, E.S.E. and Hafez, B. 2000. *Reproduction in Farm Animal* (7thed). Lippincott Williams & Wikins USA.
- Morel, D.M.C.G. 1999. *Equine Artificial Insemination*. Wallingford. Oxon. UK CABI Toelihere, 1993. Mortimer ST. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. Australia: Department of Anatomy and Histology and Institute For Biomedical Research, University of Sydney. Australia.
- Ondho, Y.S. 1985. Pengaruh Waktu dan Suhu Thawing Semen Beku terhadap Angka Konsepsi Ternak Kerbau. Tesis, Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rijsselaere, T. Ann, V.S., Geert, H., Dominiek, M. and Aart, D.K. 2004. Automated Sperm Morphometry and Morphology Analysis of Canine Semen by The Hamilton-Thorne Analyser. *Theriogenology* 62 ; 1292 – 1306.
- Rouge, M. 2003. Sperm Morphology. <http://www.electrickiva.com/lessons>. [24 Februari 2005].
- Salisbury, G.W. and Van Demark, N.L. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Terjemahan R Djanuar. Gajah Mada University Press.
- Sorenson, A.M. 1979. *Repro Lab. A Laboratory Manual for Animal Reproduction*. Animal Science Department 4thed. Texas A & M University.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Walpole, R.E. 1995. Pengantar Statistika (3rd ed). Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.