

MORFOMETRI, MORFOLOGI SERTA ABNORMALITAS SPERMATOZOA OWA JAWA
(*Hylobates moloch*) ASAL EJAKULAT

MORPHOMETRY, MORPHOLOGY AND ABNORMALITY OF SPERMATOZOA
SILVERY GIBBON (*Hylobates moloch*) FROM EJACULATES

Pudji Astuti¹, Tuty Laswardi Yusuf², Dondin Sajuthi³, Eric Hayes⁴, Teguh Budipitojo¹, Luthfiralda Sjahfirdi⁵, Hera Maheshwari²

¹Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Hewan, UGM

²Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Hewan, IPB

³Direktur Rumah Sakit Hewan, IPB; Pusat Studi Satwa Primata Primata, LP-IPB

⁴University of Washington, Seattle, Washington, USA

⁵Staf Pengajar Fakultas MIPA-Biologi, UI

ABSTRAK

Kajian biologi reproduksi tentang Owa jawa (*Hylobates moloch*) yang berstatus *critically endangered* belum pernah diungkap sama sekali. Diperkirakan hal inilah yang menyebabkan penangkaran satwa tersebut belum pernah berhasil dengan baik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memberikan nilai dasar tentang morfologi, morfometri termasuk di dalamnya abnormalitas dari spermatozoa yang sering dijumpai. Diharapkan, hasil dari penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan dalam melaksanakan program konservasi khususnya IB dan IVF.

Satwa yang digunakan dalam penelitian adalah 10 ejakulat yang berasal dari 3 ekor Owa jawa jantan yang berada di PSSP, LP-IPB, Bogor dan Kebun Binatang Taman Sari Bandung. Setelah satwa dianestesi dengan 10 mg/kg bb ketamin HCl, dilakukan pengambilan semen menggunakan RPE (*Rectal probe electrostimulation*). Semen yang diperoleh ditampung ke dalam media Bench, dilanjutkan pembuatan preparat ulas dengan pewarnaan Giemsa untuk mengamati morfologi, morfometri serta abnormalitas spermatozoa. Abnormalitas yang diamati meliputi abnormalitas primer, dan sekunder baik dari kepala, bagian tengah maupun bagian utama sampai ujung.

Dari penelitian, diperoleh hasil sebagai berikut: panjang spermatozoa owa jawa secara keseluruhan adalah 43.46 ± 5.47 um, terdiri dari panjang kepala: 5.66 ± 1.24 um dengan lebar: 4.06 ± 0.77 um, sedangkan pada bagian ekor, dibedakan menjadi bagian tengah: 5.32 ± 1.72 um; bagian utama dan ujung: 32.48 ± 4.7 um. Kepala spermatozoa berbentuk oval dengan ratio panjang/lebar: 1.41 ± 0.27 , ellipsoid: 52.81 ± 31.86 um³. Secara keseluruhan, abnormalitas spermatozoa pada Owa jawa sebesar $16\% \pm 1.22$ (kepala 3.4%; bagian tengah 5%; bagian utama sampai ujung: 7.6%). Bila dibandingkan dengan satwa primata lain, abnormalitas spermatozoa pada Owa jawa relatif lebih rendah. Sebagai data tambahan diperoleh persentase hidup spermatozoa (65 - 81%) serta motilitas yang cukup tinggi yakni berkisar antara 63 - 80% (dalam NaCl fisiologis). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ditinjau dari faktor internal, penurunan populasi Owa jawa bukan disebabkan oleh tingginya abnormalitas spermatozoa, namun oleh faktor lain yang belum diketahui.

Kata kunci: Owa jawa (*Hylobates moloch*), spermatozoa, morfometri, abnormalitas, ejaculates, Giemsa

ABSTRACT

Silvery gibbon (*Hylobates moloch*) is an endemic primate which is categorized critically endangered by the IUCN. The captive population is getting decrease because of nothing biological reproductive information. Determining the basic characteristics (morphometry and abnormality) of (*Hylobates moloch*) sperm from ejaculates is the initial step in assessing whether genome resource banking in combination with AI and/or IVF is possible using this sperm type. The objectives of this study to accumulate a database of morphometry and abnormality of silvery gibbon sperm from ejaculate whereas the advantage is to consider conservation program.

Ten ejaculates were obtained from 3 male of Silvery gibbon by RPE (Rectal Probe Electrostimulation) and macerating in 1 ml of Bench media. Then, sperm were stained with Giemsa and 100 sperm/slide evaluated for morphometry namely: length of sperm; length, width, ratio length/width, and ellipticity of head; length of midpiece; length of midpiece; length of principles and endpiece. For abnormality we evaluated: tapered, double heads, microcephalus, macrocephalus, HHA (head-to head agglutination), round of head; thickness, bend of midpiece; coiled, double and agglutination of tails. Microscope Olympus optical Ltd., model CH20, BIM F200, adapter with memory card DB12, UTV 0.5-2, on objective lense 100 magnification under immersion oil was used. The image was transferred to the monitor.

The mean morphometric measurement were length of sperm 43.46 ± 5.47 um, length of head: 5.66 ± 1.24 um, midpiece: 5.32 ± 1.72 um; principles and endpiece: 32.48 ± 4.7 um. Width of head: 4.06 ± 0.77 um, ratio length/width: 1.41 ± 0.27 , ellipsoid: 52.81 ± 31.86 um³. Totally, abnormality of silvery gibbon sperm were $16\% \pm 1.22$ (principles and endpiece 7.6%, midpiece 5% and head 3.4%). Comparing others, Silvery gibbon has lower abnormality of sperm. It concluded that decrease of captive population was not caused by internal factor namely morphometry and abnormality of sperm.

Key words: Silvery gibbon, spermatozoa, morphometry, abnormality, ejaculates, Giemsa

PENDAHULUAN

Owa Jawa merupakan salah jenis primata yang berdasarkan IUCN dikategorikan ke dalam status sangat dilindungi (*critically endangered*) (Supriatna dan Wahyudi, 2000). Karena adanya perburuan liar dan kebakaran hutan, diperkirakan satwa tersebut akan mengalami kepunahan paling tidak 20% dalam setiap 3 generasi (Llanos, 2000). Semula populasi satwa menempati habitat seluas 43.274 km², kini hanya sekitar 1608 km² atau menyusut 96% (Supriatna dan Wahyudi, 2000), sehingga jumlah populasi di Indonesia yang mampu bertahan terhadap gangguan hanya 300-400 saja (Llanos, 2000).

Kurangnya keberhasilan pembiakan satwa di penangkaran belum diketahui secara pasti, namun diperkirakan karena keterbatasan pengetahuan atau kurangnya informasi mengenai dasar-dasar biologi reproduksi. Mengingat status reproduksi hewan jantan merupakan salah satu faktor penting dalam menunjang keberhasilan penerapan teknologi reproduksi dalam pembiakan satwa, maka sebagai langkah awal karakteristik spermatozoa perlu diteliti. Karakteristik spermatozoa merupakan suatu hal yang sangat penting untuk mengidentifikasi suatu individu pejantan dan mempunyai nilai di dalam penggunaan kajian reproduksi (Young *et al.*, 1995). Dijelaskan lebih lanjut oleh Gago *et al.*, (1999), bahwa morfologi spermatozoa merupakan salah satu indikator penting dalam penentuan kualitas spermatozoa, disamping adanya pemeriksaan konsentrasi, motilitas, viabilitas, kemampuan penetrasi serta kapasitas untuk mengikat oosit (WHO, 1992). Kasa dan Thawits dalam Gago (1999) mengatakan bahwa adanya evaluasi tentang abnormalitas spermatozoa merupakan hal yang sangat penting karena hal tersebut dapat mengungkap adanya indikator terhadap stres biologi ataupun pemaparan terhadap toksikan (Gago *et al.*, 1999). Selanjutnya Lee *et al.*, (1996) mengatakan bahwa adanya abnormalitas pada kepala spermatozoa sangat berhubungan dengan adanya cacat chromosom. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan nilai dasar tentang morfometri dan abnormalitas spermatozoa Owa Jawa, sehingga diharapkan, hasil yang diperoleh dapat dijadikan sebagai bahan pertimbangan dalam melaksanakan program IB maupun IVF sebagai sarana program konservasi.

MATERI DAN METODE

Satwa yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3 ekor Owa Jawa jantan dewasa yang telah diketahui fertilitasnya, yang berada di Pusat Studi Satwa Primata (PSSP, LP-IPB) Bogor (1 ekor), dan 2 ekor dari Kebun Binatang Taman Sari, Bandung. Umur satwa berkisar antara 7 sampai 15 tahun dengan bobot badan 6.5-8.3 kg. Satwa Dari PSSP dipelihara secara individu, sedangkan dua ekor lainnya dipelihara secara berpasangan dengan pakan yang memenuhi standar

meliputi buah, sayuran, *gibbon balls* serta *monkey chow*.

Media yang digunakan untuk penampungan spermatozoa adalah Bench, yang terdiri dari mHTF (*modified Human Tubal Falopii*) + BSA 0.03 g/ml. Untuk pewarnaan spermatozoa digunakan larutan Giemsa, dengan cara pembuatan sebagai berikut: 7 ml larutan Romanovski-Giemsa ditambah dengan 160 ml dapar fosfat. Ketamin HCl dalam dosis 10 mg/kg bb digunakan untuk anestesi satwa.

Koleksi Semen.

Sepuluh ejakulat diperoleh dengan menggunakan elektroejakulator model 304 buatan PT Electronics 11241, SE 362nd, Boring, Oregon, USA. dengan cara: satwa dibaringkan telentang, batang elektroejakulator dimasukkan ke dalam rektum, tepat berada di atas kelenjar prostat (kira-kira pada kedalaman 5 cm). Elektroejakulator dihidupkan, dengan voltage 2-6 volt.

Analisis spermatozoa

Ejakulat ditampung ke dalam tabung yang berisi 1 ml Bench media, dilanjutkan dengan pembuatan preparat ulas dan pewarnaan Giemsa dengan cara: satu tetes ejakulat (10 ul) diteteskan ke dalam objek gelas, dibuat preparat ulas menggunakan cover gelas dan dibiarkan dalam temperatur kamar. Selanjutnya, preparat difiksasi ke dalam methanol selama minimal 5 menit. Proses berikutnya adalah merendam preparat ke dalam larutan Giemsa selama 30 menit, dibilas dengan dapar fosfat, dan dibiarkan kering dalam temperatur kamar (WHO, 1992). Analisis morfologi spermatozoa dilakukan dengan mikroskop Olympus optical Co.Ltd. model CH20BIMF200, T2No.3Gii483, 0.2 A, 50 Hz dengan sistem mikroskop otomatis. Perbesaran lensa objektif 40 dan 100 kali, adapter Olympus DB12, UTV 0.5 2. Mikroskop tersebut dihubungkan dengan monitor yang mempunyai *memory card*. Pengukuran dilakukan terhadap 100 spermatozoa yang mempunyai posisi lurus atau mendekati lurus. Variabel morfometri meliputi: panjang spermatozoa secara keseluruhan, kepala, bagian tengah, dan bagian utama sampai ujung. Untuk kepala, dilakukan pengukuran lebih lanjut tentang lebar kepala; eliptisitas (panjang-lebar) (panj.+lebar), rasio panjang-lebar. Untuk abnormalitas, sample diambil secara acak sampai mencapai 200 spermatozoa (Seier *et al.*, 1996). Lensa objektif yang digunakan adalah 100 kali dengan menggunakan minyak emersi. Variabel untuk abnormalitas meliputi: abnormalitas primer dan sekunder baik kepala, bagian tengah maupun bagian utama sampai ujung.

Analisis Data.

Data yang diperoleh diolah secara deskriptif untuk mencari rerata dan standar deviasi.

Tabel 1. Morfometri Spermatozoa Owa jawa (*Hylobates moloch*)

	Owa I	Owa II	Owa III	Rerata
Panjang spermatozoa (um)	43.96 ± 6.39	43.96 ± 4.54	42.46 ± 5.46	43.46 ± 5.47
Bagian tengah (um)	5.79 ± 1.56	4.80 ± 1.78	5.37 ± 1.70	5.32 ± 1.72
Bag. Utama sp ujung (um)	32.62 ± 5.00	32.24 ± 4.45	32.58 ± 4.68	32.48 ± 4.70
Panj.kepala (um)	5.51 ± 1.24	5.92 ± 1.22	5.77 ± 1.18	5.66 ± 1.24
Lebar kep. (um)	3.80 ± 0.65	4.24 ± 0.83	4.14 ± 0.81	4.06 ± 0.77
Ratio panj/lebar	1.40 ± 0.30	1.41 ± 0.24	1.41 ± 0.27	1.41 ± 0.27
Elipsoid (um ³)	55.50 ± 31.27	60.12 ± 36.10	42.81 ± 33.07	52.81 ± 31.86

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Morfometri Spermatozoa.

Dari analisis data diperoleh hasil rerata sebagai berikut: panjang spermatozoa 43.46 ± 5.47 um, terdiri dari panjang kepala: 5.66 ± 1.24 um, bagian tengah: 5.32 ± 1.72 um; bagian utama sampai ujung: 32.48 ± 4.7 um. Untuk kepala spermatozoa diperoleh hasil sebagai berikut: lebar: 4.06 ± 0.77 um, ratio panjang/lebar: 1.41 ± 0.27 , ellipsoid: 52.81 ± 31.86 (Tabel 1).

Bila dibandingkan, ukuran dan bentuk spermatozoa Owa jawa tidak terlalu jauh berbeda dengan spermatozoa manusia yakni bentuk kepala oval, ukuran panjang 3-5 um, lebar 2-3 um. Panjang badan 5-7 um, lebar 1 um, sedangkan panjang ekor 45 um. (WHO, 1992,; Indrati dan Moeloek 1997). Selain dengan manusia, panjang kepala spermatozoa pada Owa jawa juga hampir sama dengan *Macaca fascicularis* yakni 5.81 ± 0.31 um (Gago et al., 1999) sedangkan pada kuda 6.3 ± 0.4 um (Ball et al., 1995); kambing 7.53 ± 4.54 (Gravance et al., 1995).

Panjang kepala spermatozoa Owa jawa mempunyai ukuran yang hampir sama dengan *Macaca fascicularis* yakni 5.81 ± 0.31 um (Gago et al., 1999) sedangkan pada kuda 6.3 ± 0.4 um (Ball et al., 1995); kambing 7.53 ± 4.54 (Gravance et al., 1995).

2. Abnormalitas Spermatozoa

Secara keseluruhan, abnormalitas spermatozoa pada Owa jawa adalah 16 ± 1.22 % (gambar 1), meliputi abnormalitas bagian utama sampai ujung, bagian tengah dan kepala. Hasil yang ada tidak jauh berbeda dengan monyet *Macaca fascicularis* 17% (Gago et al., (1999); *Macaca nigra* 96.8 ± 1.0 % (Thomson et al., 1992); Monyet Bonnet yang ada di penangkaran 12% (Kholkute et al., 2000); monyet Bonnet di dalam habitat (86.70 ± 2.3 %); monyet vervet 30-40% (Seier, 1996). Dari ketiga jenis abnormalitas yang ada, abnormalitas bagian utama sampai ujung mempunyai persentase yang paling tinggi. Tingginya abnormalitas pada ekor juga terjadi pada monyet vervet (Seier et al., 1996); *Macaca nigra* (Thompson et al., 1992); *Common marmoset* (Cui et al., 1991) kecuali pada Tamarins. Seier et al., (1996) melaporkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa pada Tamarins adalah abnormalitas pada bagian *midpiece*.

Berbeda dengan marmoset yang hanya mempunyai 3 macam abnormalitas pada kepala

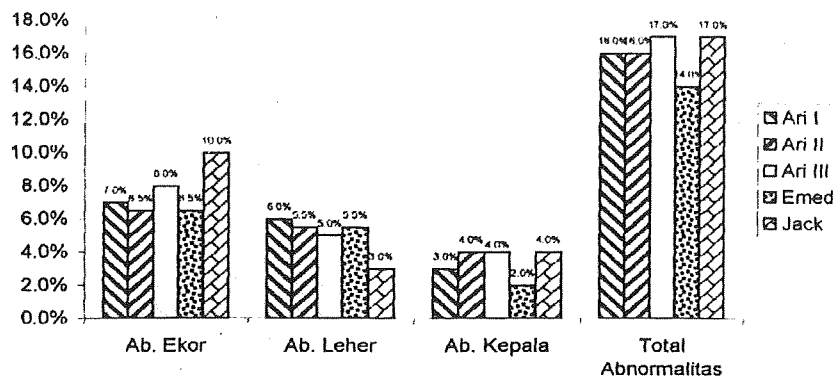
spermatozoa (Seier et al., 1996), terdapat 6 macam abnormalitas kepala spermatozoa pada Owa jawa yang meliputi: kepala ganda, lonjong, mikrosefalus, makrosefalus, HHA, dan kepala bundar. Disebut makrosefalus bila besar kepala 140% dari ukuran normal, sedangkan mikrosefalus bila ukuran kepala kurang dari 60% dari ukuran normal (WHO, 1992,; Indrati dan Moeloek 1997). Peningkatan jumlah abnormalitas spermatozoa dapat dihubungkan dengan penyakit, *heat stress*, serta musim (Neu et al., 1992). Abnormalitas kepala biasanya terjadi selama proses spermatogenesis dan spermiogenesis. Hal ini diperkuat oleh Gago et al., (1999) yang melaporkan bahwa abnormalitas kepala sangat berhubungan dengan fertilitas terutama dengan adanya cacat kromosom. Persentase tertinggi abnormalitas kepala yang dijumpai dalam penelitian adalah HHA (*head-to-head agglutination*). Tingginya proses aglutinasi biasanya erat kaitannya dengan perubahan ion kalsium dan bikarbonat di dalam media (Harayama et al., 2000); serta hilangnya anti agglutinin pada saat ejakulasi (Harayama et al., 1998). Pada pria infertile, kadar IgG maupun IgA meningkat meskipun tidak ada antibodi dalam sirkulasi (Haas et al., 1980). Kondisi HHA dapat dicegah sampai dengan 96 jam apabila spermatozoa berada dalam media HEPES pada temperatur ruangan (Feradis et al., 2001). Dijelaskan lebih lanjut oleh Garner dan Hafez (2000), bahwa adanya sel spermatozoa yang mengikat antibodi pada permukannya tidak akan mengganggu motilitas namun menjadi tidak mampu untuk melakukan penetrasi mukosa servikal.

Dari hasil yang didapat serta dari beberapa perbandingan antar primata yang lain dapat diinterpretasikan bahwa abnormalitas spermatozoa pada Owa jawa adalah relatif rendah. Sebagai data tambahan diperoleh persentase hidup spermatozoa (65-81%) serta motilitas yang cukup tinggi yakni berkisar antara 63-80% (dalam NaCl fisiologis. Ini berarti bahwa ketidakberhasilan pembiakan satwa di penangkaran bukan disebabkan oleh rendahnya kualitas spermatozoa (faktor internal) namun oleh faktor-faktor lain yang belum diketahui.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan terselesaikannya penulisan karya ilmiah ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada Kepala PSSP-LP IPB, Bogor, ibu Dra.

Abnormalitas Spermatozoa



Gambar 1. Persentase abnormalitas spermatozoa Owa Jawa yang ada di PSSP-LP IPB, Bogor dan Kebun Binatang Taman Sari Bandung.

Dewi Lengkana MM, Drh. Thamrin, Direktur PT Wanara Satwa Loka, serta Drh. Diah Pawitri.

DAFTAR PUSTAKA

Ball BA and Mohammed HO. 1995. Morphometry of Stallion Spermatozoa By Computer-Assisted IMAGE Analysis. *Theriogenology* 44: 367 377.

Feradis AH, Pawitri D, Suatha IK Amin MR, Yusuf TL, Sajuthi D, Budiarsa IN and Hayes E. 2001. Cryopreservation of Epididymal Spermatozoa Collected by Needle Biopsy from Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 30: 100 106

Gago C, Peres-Sanches, F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG and Soler C, 1998. Standardization of Sampling and Staining Methods for Morphometric Evaluation of Sperm Heads in the *Cynomolgus Monkey* (Mf) Using Computer Assisted Image Analysis. *Int. Androl.* 21(3): 169 76

Gago C, Peres-Sanches F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG and Soler, C. 1999. Morphological Characterization of Ejaculated Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) Sperm. *Am. J. Primatol.*; 47: 105 115

Garner DL, and Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma in: *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed., Lea and Febiger, Philadelphia. Pp 165 187

Gravance CG, Lewis KM, and Casey PJ. 1995. Computer Automated Sperm Head Morphometry Analysis (ASMA) of Goat Spermatozoa. *Theriogenology* 44: 989 1002

Haas GG, Cines DB, and Schreiber AD. 1980. Immunologic infertility: Identification of patient with antisperm antibody. *New. Eng. J. Med* 303: 722 727

Harayama H, Masashi M, Osamu S, Eiji I and Seishiro K. 1998. Effects of Calcium and Bicarbonat on

Head-to-head agglutination in Ejaculated Boar. *Reprod. Fert. Dev.* 10: 445 450

Harayama H, Pao-chi L, Gage DA, Masashi M, Seishiro K and Hammersteidt RH. 2000. Biochemical Characterization of Sialoprotein "anti-agglutinin" Purified from Boar Epididymal and Seminal Plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 96 103

Indrati G dan Moeloek N, 1997. Karakteristik Sperma dan Hasil Fertilisasi Terbantu pada Manusia Melalui SUZI dan ICSI. *Majalah Kesehatan Ind, Th.* XXV: 2: 107 112

Kholkute SD, Kamala GK, and Puri CP. 2000. Variations in Seminal Parameters Over a 12-month Period in Captive Bonnet Monkeys. *Primates.* 4(4): 393-405

Llanos M. 2000. Expert List 25 Primates Most in Peril. <http://www.msnbc.com/news355577.asp?cpl>.

Neu SM, Timoney PJ and Lowry SR. 1992. Changes in Semen Quality in the Stallion Following Experimental Infection with Equine Arthritis virus: 37:2: 407 - 431

Seier JV, Horst Gvd, and Laubscher R. 1996. Abnormal Morphology of Vervet Monkey Sperm. *J. Med. Primatol.* 25: 397-403

Thomson JA, Illif-Sizemore SA, Gliessman PM and Wolf DP 1992. Collection and Fertilization potential of sperm form The Sulawesi Crested black Macaque (*Macaca nigra*). *Am. J. Primatol.* 28: 289-297

Wahyudi EH, dan Supriatna J. 2000. Panduan Lapangan Primata Indonesia. Yayasan Obor, Pp: 255 - 265

Young LG, Smithwick EB and Gould KG. 1995. Characteristics of Chimanzee (*Pan troglodytes*) Ejaculates Collected by Rectal Probe Electrostimulation and by Artificial Vagina. *Am. J. Primatol.*: 35: 2293-304