Faktor-faktor yang Mempengaruhi Analisis Motilitas Spermatozoa dengan Menggunakan CASA

(Factors Affecting Spermatozoa Motility Analysis Using CASA)

Dian Ratnawati¹, N Isnaini² dan T Susilawati²

¹Loka Penelitian Sapi Potong, Jalan Pahlawan no. 2, Grati, Pasuruan

²Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Ketawanggede, Lowokwaru, Malang 6514
Kontributor utama: dian_sapo@yahoo.co.id

(Diterima 1 Agustus 2019 – Direvisi 3 September 2019 – Disetujui 4 September 2019)

ABSTRACT

Motility is a very important parameter to determine the quality of semen. Spermatozoa motility assessment can be done manually (subjectively) or with CASA. The superiority of motility assessment using CASA compared to manually is more objective, accurate, fast, efficient and able to provide detailed motility of spermatozoa. However, in implementation, assessments with CASA produce varied data. So far, there has not been a spermatozoa motility standard with CASA, except by minimizing variations in the factors that influence the results of analysis with CASA. The purpose of this paper is to describe factors that affecting spermatozoa motility analysis using CASA to reach optimal motility analysis. Some influencing factors include: CASA settings, semen diluent, spermatozoa concentration, chamber, analyst, sample preparation and analysis time. Recommendation standard motility assessments using CASA include: experienced and consistent analysts, sample preparation properly (mixing, pipeting and sampling), spermatozoa concentration of 20 million/ml, consistent in chamber type (conditioned 37°C), semen diluents and CASA settings (frame rate of 60 Hz and frame per field 30) and fast implementation of analysis (<2 minutes).

Key words: Spermatozoa, motility, CASA, optimum

ABSTRAK

Motilitas merupakan parameter yang sangat penting untuk menentukan kualitas semen. Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan manual (subyektif) atau dengan CASA. Keunggulan penilaian motilitas menggunakan CASA dibandingkan secara manual adalah lebih obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail. Namun dalam pelaksanaannya, penilaian dengan CASA menghasilkan data yang bervariasi. Sejauh ini, belum terdapat standar penilaian motilitas spermatozoa dengan CASA, kecuali dengan meminimalkan variasi pada faktor-faktor yang mempengaruhi hasil analisis dengan CASA. Tujuan penulisan ini adalah menguraikan faktor-faktor yang mempengaruhi analisis motilitas spermatozoa dan rekomendasi analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA untuk menghasilkan penilaian motilitas yang optimal. Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa dengan CASA diantaranya: Pengaturan CASA, semen, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, *chamber*, analis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis. Rekomendasi standar penilaian motilitas dengan menggunakan CASA adalah: Analis yang berpengalaman dan konsisten, preparasi sampel (*mixing*, *pipeting* dan *sampling*) yang tepat, konsentrasi spermatozoa 20 juta/ml, tipe *chamber* konsisten (dikondisikan 37°C), pengencer yang konsisten dan setingan CASA yang konsisten (*frame rate* 60 Hz dan *frame per field* 30) dan pelaksanaan analisis yang cepat (<2 menit).

Kata kunci: Spermatozoa, motilitas, CASA, optimal

PENDAHULUAN

Indonesia sangat kaya dengan sumber daya genetic dan salah satu diantaranya adalah sapi potong. Penetapan rumpun sapi potong lokal telah ditetapkan dalam Kepmentan No 325/Kpts/OT.140/1/2010 untuk sapi Bali, Kepmentan No 3735/Kpts/HK.040/11/2010 untuk sapi Madura dan Kepmentan No 2841/Kpts/LB.430/8/ 2012 untuk sapi PO. Sapi potong lokal Indonesia mempunyai banyak keunggulan, diantaranya: kemampuan kerja baik, daya adaptasi

terhadap lingkungan, pakan terbatas, cekaman panas dan penyakit ternak yang baik, fertilitas tinggi dan persentasi karkas yang tinggi (pada sapi Bali).

Produktivitas ternak secara garis besar ditentukan oleh faktor sapi jantan dan sapi betina. Produktivitas sapi pejantan menentukan produktivitas sapi betina. Sapi pejantan fertil dibutuhkan untuk dapat membuntingi sapi betina sehingga dihasilkan keturunan. Standar fertilitas sapi pejantan dengan BSE (*Breeding Soundness Evaluation*) diantaranya kualitas semen dan lingkaran skrotum (Bruner et al. 1995; Parker et al. 1999). Jumlah produksi dan kualitas semen yang

dihasilkan pada sapi potong dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya: genetik, bangsa ternak, umur dan berat badan pejantan, pakan, suhu, musim, frekuensi dan ejakulasi (Sarastina et al. 2006). Bangsa ternak juga menentukan sifat semen yang dihasilkan, diantaranya: motilitas spermatozoa, spermatozoa normal dan jumlah abnormalitas primer spermatozoa (Chenoweth et al. 1996).

Motilitas spermatozoa merupakan salah satu parameter penting dalam penilaian kualitas semen. Motilitas spermatozoa memegang peranan penting dalam pencapaian spermatozoa ke *oosit* dan menembus *zona pellucida*. Nilai motilitas menunjukkan status daya hidup dan metabolisme spermatozoa serta status dari membran sel spermatozoa. Spermatozoa motil apabila mempunyai membran sel yang utuh, sedangkan spermatozoa tidak motil mempunyai membran sel yang tidak utuh atau rusak (Sarastina et al. 2006). Terdapat 2 faktor utama yang menentukan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Ducha et al. 2014). Keutuhan membran mempunyai peran utama dalam membentuk ikatan dengan *zona pellucida*, sedangkan peran motilitas spermatozoa dalam upaya menembus *cumulus* dan *zona pellucida*.

Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan secara subyektif (*biased*) dan bersifat sangat peka terhadap perubahan lingkungan. Penilaian motilitas secara subyektif atau manual biasanya dilakukan oleh lebih dari 1 analis yang sudah berpengalaman dalam melakukan analisis motilitas spermatozoa. Parameter motilitas spermatozoa meliputi beberapa kriteria, diantaranya: persentasi spermatozoa motil progresif, dan jumlah total spermatozoa motil. Terdapat prosedur penilaian motilitas spermatozoa yang lebih obyektif (*unbiased*) diantaranya dengan spektrofotometri, *time-lapse-photomicrography*, *videomicrography* dan *computerized analysis* (CASA). Prinsip kerja CASA adalah menangkap gerakan obyek (spermatozoa) pada lintasannya. Keunggulan penilaian motilitas menggunakan CASA dibandingkan secara manual adalah lebih obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail. Namun dalam pelaksanaannya, penilaian dengan CASA menghasilkan data yang bervariasi. Banyak faktor yang mempengaruhi diantaranya: setingan CASA, semen, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, *chamber*, analis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis. Sejauh ini, belum terdapat standar motilitas spermatozoa dengan CASA, kecuali dengan meminimalkan variasi pada faktor-faktor yang mempengaruhi hasil analisis dengan CASA.

Tujuan penulisan ini adalah menguraikan faktor-faktor faktor-faktor yang mempengaruhi analisis motilitas spermatozoa dan rekomendasi analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA untuk menghasilkan penilaian motilitas yang optimal.

PARAMETER MOTILITAS SPERMATOZOA DENGAN CASA

Salah satu parameter penilaian fertilitas pada sapi pejantan (*breeding soundness evaluation*) adalah kualitas semen sapi pejantan dan lingkaran skrotum. Kualitas semen pada sapi pejantan diantaranya: volume 5-8 ml, motilitas 40-75%, konsentrasi 800-2000 juta/ml, spermatozoa normal mencapai 65-95% dan rentang pH 6,4-7,8 (Garner & Hafez 2008). Syarat seekor pejantan dapat digunakan sebagai sumber semen adalah konsentrasi spermatozoa minimal 500 juta/ml, motilitas progresif 50%, persentasi morfologi normal spermatozoa minimal 80% dan abnormalitas spermatozoa dibawah 20%. Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) menggunakan standar motilitas progresif 70% untuk semen segar yang layak diproses menjadi semen cair maupun semen segar, dengan standar nilai motilitas setelah *thawing* mencapai 40%.

Dalam *breeding soundness evaluation*, parameter kualitas semen yang paling utama pada adalah morfologi spermatozoa dan motilitas spermatozoa. Definisi motilitas spermatozoa adalah jumlah spermatozoa motil yang hidup dan bergerak progresif dengan kisaran nilai 0-100%. *Computerized Assisted Sperm Analyzer* merupakan suatu metode analisis spermatozoa dengan mengoptimalkan perangkat komputer. Mekanisme kerja CASA adalah melalui identifikasi pola gerakan kepala spermatozoa dan pola lintasan yang dilalui spermatozoa. Manfaat dan keunggulan CASA diantaranya: obyektif, akurat, cepat, efisien dan mampu memberikan gambaran motilitas spermatozoa secara detail (Didion 2008). Dalam penilaian motilitas dengan menggunakan CASA, penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan secara lebih detail dengan parameter motilitas yang terukur lebih banyak.

Beberapa parameter motilitas yang dapat terukur dengan CASA dan batasan definisinya:

Motilitas

Definisi motilitas spermatozoa sangat bervariasi dan mempunyai batasan kriteria tersendiri. Motilitas spermatozoa merupakan spermatozoa yang bergerak dengan kecepatan $>5 \mu\text{m/s}$ (Massanyi et al. 2008). *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan motilitas spermatozoa sebagai persentasi spermatozoa yang bergerak dengan $\text{VAP} >0 \mu\text{m/s}$, merupakan penjumlahan dari 3 kategori gerakan spermatozoa menurut WHO (*fast progressive*, *slow progressive* dan *motile non progressive*). Standar motilitas WHO tersebut dijadikan acuan untuk standar motilitas pada hewan karena memang belum tersedia.

Motilitas progresif

Sebagaimana dengan motilitas, definisi motilitas progresif juga mempunyai banyak versi. Motilitas progresif merupakan spermatozoa yang bergerak dengan kecepatan $>20 \mu\text{m}/\text{detik}$ (Massanyi et al. 2008). *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan motilitas spermatozoa progresif merupakan persentasi spermatozoa yang bergerak dengan VAP $>25 \mu\text{m}/\text{s}$, merupakan penjumlahan dari 2 kategori gerakan spermatozoa menurut WHO (*fast progressive* dan *slow progressive*).

Hiperaktif spermatozoa

Hiperaktif spermatozoa merupakan suatu kondisi yang menggambarkan spermatozoa bergerak dengan sangat cepat namun kurang linear dan cenderung memutar atau membentuk pola lintasan seperti bintang (*star shaped pattern*). Parameter yang digunakan untuk menggambarkan suatu kondisi spermatozoa hiperaktif adalah VCL, LIN dan ALH. Terdapat banyak standar kriteria spermatozoa hiperaktif. Spermatozoa dikategorikan hiperaktif apabila mempunyai batas nilai VCL $>150 \mu\text{m}/\text{s}$, LIN $<50\%$ dan ALH $>5 \mu\text{m}$; LIN $<60\%$, ALH $>7,5 \mu\text{m}$ dan VCL $>100 \mu\text{m}/\text{s}$ (Ripp et al. 2003); LIN $<60\%$, ALH $\geq 5 \mu\text{m}$ dan VCL $>100 \mu\text{m}/\text{s}$ (Shibahara et al. 2003); VCL $>200 \mu\text{m}/\text{s}$ dan LIN $<20\%$ (Van der Horst 2014).

Distance Curve-Line (DCL), Distance Straight-Line (DSL) dan Distance Average Path (DAP)

Komponen parameter jarak tempuh spermatozoa menggunakan CASA diantaranya: DCL, DSL dan DAP. *Distance Curve-Line* (DCL) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve*. *Distance Straight-Line* (DSL) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight*. *Distance Average Path* (DAP) merupakan jarak yang dapat ditempuh oleh spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur.

Velocity Curve Linear (VCL), Velocity Straight Linear (VSL) dan Velocity Average Pathway (VAP)

Komponen parameter kecepatan spermatozoa menggunakan CASA diantaranya VCL, VSL dan VAP. *Velocity Curve Linear* berarti *Curve Linear Velocity* (VCL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *curve* (Sarastina et al. 2006). *Velocity Straight Linear* (VSL) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan *straight* (Sarastina et al. 2006). *Velocity Average Pathway*

(VAP) merupakan *velocity* spermatozoa dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur.

Linearity (LIN), Straightness (STR) dan Wobble (WOB)

Komponen parameter pola renang spermatozoa dengan menggunakan CASA diantaranya LIN, STR dan WOB. *Linearity* merupakan indikator kelurusan lintasan *curve linear*. *Straightness* merupakan indikator kelurusan lintasan rata-ratanya. *Wobble* merupakan pengukuran osilasi lintasan sebenarnya, mengindikasikan kuatnya goyangan spermatozoa selama satu detik.

Amplitude Lateral Head (ALH), Beat Cross Frequency (BCF), Average Orientation dan Change of Head (AOH)

Komponen parameter pola pergerakan kepala spermatozoa menggunakan CASA diantaranya: ALH, BCF dan AOH. *Amplitude Lateral Head* menunjukkan lebar rata-rata dari osilasi (getaran atau vibrasi) kepala spermatozoa saat berenang (Kathiravan et al. 2011). *Beat Cross Frequency* merupakan frekuensi (banyaknya) lintasan spermatozoa melalui rata-rata alur per detik. *Average Orientation Change of Head* (AOH) merupakan rata-rata derajat perubahan gerakan kepala spermatozoa (Sarastina et al. 2006).

FAKTOR-FAKTOR YANG MEMPENGARUHI ANALISIS MOTILITAS SPERMATOZOA DENGAN CASA

Computerized Assisted Sperms Analyzer (CASA) merupakan instrumen yang sangat bermanfaat untuk mengkarakterisasi gerakan spermatozoa karena bersifat obyektif, independen (dari interpretasi teknis) dan mampu mengidentifikasi gerakan spesifik spermatozoa. Setiap sampel spermatozoa dianalisis secara langsung pada citra digital (*digital image*), diantaranya gerakan kepala maupun kecepatan pergerakan spermatozoa (Lange-Consiglio et al. 2013). Jenis atau tipe CASA berpengaruh terhadap hasil penilaian motilitas spermatozoa. Hal ini disebabkan oleh setiap jenis/tipe CASA mempunyai standar lintasan spermatozoa (*sperm trajectory*) tersendiri dengan algoritma (cara perhitungan) yang berbeda. Karakteristik *hardware* yang digunakan setiap CASA juga berbeda. Beberapa CASA yang biasanya digunakan untuk analisis motilitas spermatozoa, diantaranya:

- *Sperm Class Analyzer*, Microptic, Spain.
- Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA.
- Sperm Vision, Minitube, Tiefenbach, Germany.

- IVOS II and CEROS II, IMV Technology, France.

Upaya pemeliharaan CASA harus menjadi perhatian khusus untuk menjamin data yang dihasilkan akurat. *Software* dan *hardware* CASA harus divalidasi secara rutin untuk menghindari data yang kurang akurat atau presisi (Amann & Waberski 2014).

Hasil analisis motilitas spermatozoa menggunakan CASA sangat bervariasi dan sejauh ini belum tersedia standar protokol penilaian kualitas semen berbasis CASA. Beberapa faktor yang berdampak pada penilaian motilitas spermatozoa dengan CASA, diantaranya: setingan CASA, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, *chamber*, analisis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis.

Setingan CASA (frame rate dan frame per field)

Frame rate merupakan jumlah *frame*/gambar pergerakan spermatozoa yang diambil dalam waktu 1 detik. *Frame rate* berpengaruh terhadap VCL spermatozoa. *Frame rate* 50-60 menghasilkan VCL spermatozoa yang proporsional (Perreault 2002). *Frame rate* 50-60 fps (Hz) artinya bahwa setiap gambar diambil dalam waktu 1/50-1/60 detik sehingga semakin tinggi *frame rate* menunjukkan semakin banyak pergerakan spermatozoa yang dapat ditangkap. Banyak setingan *frame rate* CASA yang lainnya, misal 25, 30, 40 atau 60. Hasil analisis motilitas spermatozoa dengan *frame rate* yang berbeda, menghasilkan data yang berbeda dan tidak dapat dibandingkan satu dengan lainnya. Data hasil analisis dapat dibandingkan apabila menggunakan setingan *frame rate* yang sama. Beberapa CASA biasanya sudah diseting dengan setingan perusahaan yang memproduksinya. Namun demikian, tidak menutup kemungkinan bahwa setingan yang ada dapat berubah untuk mengoptimalkan penilaian. *Frame rate* 60 memberikan hasil penilaian motilitas spermatozoa yang optimal. Kondisi ini menghasilkan motilitas spermatozoa yang lebih riil (sebenarnya). *Frame rate* yang semakin tinggi berpengaruh terhadap peningkatan kecepatan pergerakan dan vigor spermatozoa, demikian berlaku sebaliknya (Contri et al. 2010). Tardif et al. (1997) dan Amann & Waberski (2014) menyarankan bahwa setingan CASA harus divalidasi secara periodik untuk menjamin data yang dihasilkan.

Frame per field juga mempunyai peran dalam menghasilkan data motilitas spermatozoa dengan CASA. *Frame per field* merupakan jumlah *frame* atau gambar yang diambil dalam setiap bidang pandang. *Frame per field* berkorelasi positif dengan waktu yang dibutuhkan untuk melakukan analisis. Semakin tinggi *frame per field* membutuhkan waktu yang lebih lama untuk analisis. Hal ini berpengaruh terhadap spermatozoa yang diamati dan dapat menghasilkan data yang

bias. Beberapa studi menerapkan *frame per field* 30, 45 (Contri et al. 2010). Untuk menghasilkan data yang lebih akurat, setingan *frame per field* yang lebih rendah lebih direkomendasikan.

Pengencer semen

Semen yang mengandung spermatozoa harus melalui proses pengenceran terlebih dahulu supaya dapat dianalisis dengan optimal menggunakan CASA. Pengencer yang dicampur dengan spermatozoa berperan dalam menentukan nilai motilitas spermatozoa (Lange-Consiglio et al. 2013; Contri et al. 2010). Pada dasarnya, semua pengencer dapat digunakan sebagai pengencer spermatozoa. Syarat kriteria pengencer yang layak harus dipenuhi terlebih dahulu sebelum digunakan sebagai pengencer, diantaranya berfungsi sebagai sumber energi, buffer, mencegah *cold shock*, menambah masa dll. Perbedaan jenis dan kuantitas komponen pengencer berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa yang dihasilkan. Banyak pengencer semen yang dapat digunakan untuk analisis motilitas dengan CASA, diantaranya: sodium-sitrat (Islam et al. 2017); tris aminomethane, dan CEP-2 (Ratnawati 2017); PBS dan NaCl 0,9% (Contri et al. 2010); CUE dan EYGT (Tardif et al. 1997).

Hasil observasi sebelumnya (*unpublished*), pengencer dengan bahan dasar susu tidak disarankan digunakan dalam pemeriksaan motilitas menggunakan CASA. Penggunaan pengencer berbahan dasar susu mengganggu tampilan spermatozoa pada layar. Dalam tampilan layar CASA, akan terlihat partikel lain berbentuk bulatan/debris yang berukuran lebih kecil, sama atau mungkin lebih besar dari spermatozoa. Hal ini akan membiaskan penilaian oleh CASA karena ukuran yang sama dengan ukuran spermatozoa sehingga teridentifikasi sebagai *static sperms*. Dampaknya adalah nilai motilitas yang bias atau tidak mewakili motilitas yang sebenarnya. Selain itu, keberadaan partikel tersebut mengganggu keleluasaan spermatozoa untuk bergerak (motilitas rendah).

Faktor lain yang mempengaruhi tampilan spermatozoa pada layar CASA dalam pengencer adalah keberadaan bahan biologis. Dalam mengoptimalkan fungsi pengencer, biasanya pengencer ditambahkan bahan biologis tertentu. Kuning telur atau putih telur biasanya menjadi komponen pengencer yang berfungsi sebagai anti *cold shock*, *cryoprotectant* maupun antioksidan. Se jauh pengamatan (*unpublished*) keberadaan bahan biologis dalam layar CASA tidak mengganggu tampilan spermatozoa dalam layar. Namun demikian, dibutuhkan teknik tersendiri dalam menentukan titik pengambilan sampel. Pada semen cair yang sudah melalui masa simpan, materi komponen biologis dan spermatozoa mengendap di bagian bawah sehingga dibutuhkan homogenisasi terlebih dahulu.

Setelah campuran homogen, sebaiknya dibiarkan beberapa saat dan dilakukan pipeting pada posisi campuran yang tidak terlalu pekat (bagian atas). Hal ini untuk menghindari terikutnya komponen biologi yang berpotensi mengganggu pengamatan motilitas dengan CASA.

Disarankan penggunaan pengencer spermatozoa yang sama (konsisten) dapat mengurangi faktor kesalahan penilaian motilitas spermatozoa dengan CASA. Pengencer sederhana yang dapat digunakan dalam penilaian dan mudah didapatkan diantaranya PBS dan larutan *isotonic* (larutan 0,9% NaCl) (Contri et al. 2010).

Konsentrasi spermatozoa

Konsentrasi spermatozoa merupakan jumlah spermatozoa dalam setiap ml, berpengaruh dalam penilaian motilitas dengan CASA. Konsistensi sampel berpengaruh terhadap data analisis yang dihasilkan CASA. Hal ini terkait langsung dengan konsentrasi spermatozoa dalam sampel (Perreault 2002). Konsentrasi spermatozoa yang terlalu tinggi menyebabkan *collision* kepala spermatozoa saling menempel (*collision*) dalam lintasannya (Lange-consiglio et al. 2013; Contri et al. 2010; Pagl et al. 2006). Populasi yang padat menyebabkan pergerakan spermatozoa juga terbatas atau tidak leluasa sehingga cenderung menurunkan potensi motilitas yang sebenarnya. Kondisi ini menyebabkan CASA tidak dapat menangkap semua pergerakan spermatozoa (*sperm trajectory*) atau hanya sebagian saja, sehingga hasil analisis motilitas yang dihasilkan tidak mewakili kondisi yang sebenarnya dari pergerakan spermatozoa.

Konsentrasi spermatozoa sebelum dianalisis menggunakan CASA adalah 20 juta/ml dan tidak disarankan konsentrasi spermatozoa 50 juta/ml dan 100 juta/ml (Contri et al. 2010; Lange-consiglio et al. 2013). Analisis motilitas juga dapat dilakukan pada konsentrasi spermatozoa yang lebih rendah, diantaranya 2-50 juta/ml (Peng et al. 2017); 5 juta/ml, 10 juta/ml (Contri et al. 2010). Konsentrasi yang lebih rendah menghasilkan hasil yang lebih baik dalam penilaian motilitas menggunakan CASA karena setiap lintasan spermatozoa dapat tertangkap oleh CASA dan dianalisis dengan sempurna. Namun demikian, konsentrasi spermatozoa 20 juta/ml lebih banyak direkomendasikan untuk hasil analisis motilitas spermatozoa yang lebih optimal.

Chamber/counting chamber

Terdapat berbagai macam tipe *chamber* yang dapat digunakan dalam pemeriksaan motilitas menggunakan CASA. Secara garis besar terdapat 2

jenis *chamber*, yaitu yang diisi dengan meneteskan sampel (*dropping*) atau melalui kapiler (*capillary forces*). *Chamber* dengan *dropping* diantaranya *Makler chamber* dan *Goldcyto chamber*. Sedangkan *chamber* dengan *capillary forces* diantaranya: *ledja*, *microscope slide*, *cover* (Peng et al. 2017), *zander spermometer*, *leica* (Massanyi et al. 2008). Semua *chamber* harus dikondisikan pada suhu 37°C sebelum sampel dimasukkan, hal ini untuk menghindari data hasil analisis yang bias (Contri et al. 2010).

Setiap *chamber* mempunyai bentuk, kedalaman dan kapasitas volume *chamber* tersendiri. Perbedaan ini berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa dalam *chamber* (Peng et al. 2017) dan pergerakan spermatozoa (Lange-consiglio et al. 2013; Contri et al. 2010), baik nilai motilitas progresif atau parameter kinetiknya. Penggunaan *Makler chamber* menghasilkan hasil konsentrasi spermatozoa yang lebih tinggi (*over estimated*) daripada *chamber* yang lain sehingga lebih disarankan untuk digunakan dalam analisis motilitas yang tidak menuntut akurasi yang tinggi. Salah satu penyebab *over-estimated* perhitungan konsentrasi adalah keterbatasan CASA dalam membedakan spermatozoa dengan garis terang (*bright grids*) yang berada dalam *Makler chamber*. *Chamber* dengan penekanan kapiler (*capillary forces*) menghasilkan nilai konsentrasi dan motilitas yang lebih rendah dari kondisi yang sebenarnya. (Peng et al. 2017). Penyebab konsentrasi yang lebih rendah ini adalah adanya efek Segre-Silberberg yang menyebabkan perhitungan yang lebih rendah pada bagian tengah dan atas *chamber* daripada pada bagian bawah *chamber*. Motilitas yang rendah disebabkan adanya efek toksik dari cat maupun perekat terhadap spermatozoa yang menyebabkan kerusakan pada membran sel spermatozoa dan aksi kapiler yang menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga motilitas yang dihasilkan rendah (Hoogewijs et al. 2012; Gloria et al. 2013).

Penggunaan *ledja* menghasilkan jumlah spermatozoa non motil lebih tinggi spermatozoa yang bergerak cepat lebih rendah (Contri et al. 2010). Hasil pengamatan sebelumnya (unpublished) bahwa penggunaan *ledja* dan mikroskop slide tidak menghasilkan motilitas spermatozoa yang berbeda, kecuali nilai hiperaktif spermatozoa. Perbedaan kedalaman *chamber* dan sifat adhesif permukaan *chamber* yang menyebabkan perbedaan hasil analisis motilitas spermatozoa. Setiap *chamber* mempunyai kelebihan dan kekurangan tersendiri, namun untuk meminimalisasi faktor kesalahan, penggunaan *chamber* harus sama atau konsisten.

Analisis laboratorium

Faktor analisis dapat mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA.

Penilaian motilitas secara subyektif dengan mikroskop cahaya, biasanya dilakukan oleh lebih dari 2 analis yang berpengalaman untuk meminimalkan tingkat kesalahan. Namun demikian, dalam melakukan penilaian motilitas dengan CASA, seharusnya dilakukan secara konsisten oleh seorang analis (andrologis) yang berpengalaman. Hal ini juga bertujuan untuk meminimalkan faktor kesalahan atau variasi hasil analisis. Penggunaan jenis CASA yang sama dengan setingan CASA, tipe *chamber*, pengencer, konsentrasi yang sama dapat menghasilkan data yang berbeda. Hal ini terkait dengan keahlian analisis dalam preparasi sampel dan pemilihan *field*/ bidang pandang pada layar CASA.

Preparasi sampel

Preparasi sampel berpengaruh terhadap hasil penilaian dengan CASA (Contri et al. 2010), diantaranya: *pipeting* dan *mixing* dan *sampling* sampel. *Mixing* dan *pipeting* sampel semen mempunyai peranan penting dalam menentukan hasil penilaian motilitas menggunakan CASA. *Mixing* biasanya dilakukan pada spermatozoa yang disimpan dalam suhu dingin atau beku. Faktor penyimpanan menyebabkan spermatozoa menumpuk di bagian bawah sehingga sebaiknya sampel di *mixing* sebelum analisis dilakukan. *Mixing* dilakukan dengan perlahan dan hati-hati, sampai dengan homogen. Resiko *mixing* yang tidak homogen berpengaruh terhadap sampel yaitu kepadatan spermatozoa yang terlalu tinggi maupun terlalu rendah. Spermatozoa yang terlalu padat menyebabkan lintasan spermatozoa tidak dapat ditangkap oleh CASA secara optimal.

Pipeting (cara pengambilan sampel dengan pipet) dan *sampling* (cara pengambilan sampel) juga mempunyai peran dalam menghasilkan data motilitas menggunakan CASA. *Pipeting* merupakan kelanjutan dari *mixing*, namun hasil akan lebih optimal apabila diberikan jarak beberapa menit sebelum dilakukan *pipeting*. Sampel yang telah homogen, kemudian disampling dengan cara *pipeting* pada titik tertentu. Cara pengambilan sampel dilakukan pada titik pengambilan (collection site) dengan tingkat kepadatan sedang, hal ini untuk menghindari konsentrasi spermatozoa yang terlalu padat sehingga lintasan spermatozoa dapat tertangkap oleh CASA secara optimal (Perez-Sanchez et al. 1996). Preparasi sampel harus divalidasi secara periodik untuk menjamin data yang dihasilkan (Tardif et al. 1997; Amann & Waberski 2014).

Waktu pelaksanaan analisis

Waktu pelaksanaan analisis harus dilakukan secepat mungkin, karena hal ini berpengaruh terhadap hasil analisis motilitas spermatozoa yang dihasilkan. Semakin lama pelaksanaan analisis maka kualitas spermatozoa semakin menurun. Pelaksanaan analisis motilitas dengan CASA harus mempertimbangkan kesiapan setingan CASA, kesiapan sampel (pengencer dan konsentrasi sampel), pemasukkan sampel ke *chamber*. Disarankan waktu pelaksanaan analisis tidak lebih dari 2 menit untuk menjamin data yang dihasilkan *valid* (Contri et al 2010).

REKOMENDASI PENGGUNAAN CASA

Penggunaan CASA untuk analisis motilitas memang mempunyai banyak keunggulan dibandingkan penilaian secara manual. Namun demikian sejauh ini banyak sekali faktor yang mempengaruhi hasil penilaian motilitas dengan CASA. *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) *Andrology Special Interest Group* (1998) menyatakan bahwa tidak ada sistem CASA maupun tipe *chamber* yang sempurna dalam penilaian motilitas. Upaya pendekatan yang dapat dilakukan adalah meminimalkan faktor-faktor yang mempengaruhi hasil penilaian motilitas spermatozoa sehingga meminimalkan faktor kesalahan.

Dari ulasan diatas dihasilkan suatu rekomendasi standar penilaian motilitas dengan menggunakan CASA diantaranya: dilakukan oleh analis yang berpengalaman dan konsisten, preparasi sampel (*mixing*, *pipeting* dan *sampling*) yang tepat, konsentrasi spermatozoa 20 juta/ml, konsisten dalam tipe *chamber* (dikondisikan 37°C), pengencer semen dan setingan CASA (*frame rate* 60 Hz dan *frame per field* 30) dan pelaksanaan analisis yang cepat (<2 menit).

PEMANFAATAN CASA DALAM BIDANG REPRODUKSI SAPI POTONG

Dalam bidang reproduksi sapi potong, khususnya dalam pelaksanaan analisis kualitas semen, CASA semakin memberikan peranan yang besar saat ini. Pemanfaatan CASA dalam analisis kualitas semen diantaranya sebagai alat (*tool*) untuk menganalisis motilitas (kinematik), konsentrasi morfologi, dan morfometri. Versi baru CASA dapat digunakan untuk analisis *vitality*, DNA fragmentasi, integritas dan reaksi

akrosom (Van der Horst et al. 2018). Setiap fungsi analisis CASA memberikan parameter yang lebih banyak dan gambaran yang lebih detail terkait spermatozoa sapi, sehingga hasil analisis dengan CASA lebih baik daripada evaluasi secara visual (subyektif). Pengulangan dalam pengukuran parameter kualitas semen pada babi menggunakan CASA menghasilkan koefisien variasi yang lebih rendah dari 10% dibandingkan dengan penilaian secara visual (subyektif) sehingga hasilnya lebih akurat (Vyt et al. 2004; Broekhuijse et al. 2011).

Pemanfaatan CASA di Indonesia mulai banyak digunakan dalam bidang penelitian maupun balai inseminasi. Ratnawati (2017) menggunakan CASA (SCA v.5.2) untuk mengobservasi kualitas semen cair pada tiga bangsa sapi potong menggunakan tiga jenis pengencer. Syarifuddin et al. (2018) menggunakan CASA (Sperm Vision v.3.7.5) untuk menganalisis kualitas semen sapi Bali dengan perlakuan pakan berbeda. Sarastina et al. (2006) menggunakan CASA (*sperm vision*) untuk menganalisis parameter motilitas pada beberapa bangsa sapi potong.

Dalam perkembangannya, metode analisis spermatozoa dengan sistem CASA mengalami banyak kemajuan. Pada manusia sudah ditemukan aplikasi berupa sistem CASA berbasis *smartphone* (SEEM) untuk menganalisis spermatozoa pada pria. Teknologi ini dalam upaya menjawab tantangan bahwa analisis spermatozoa dengan sistem CASA ternyata mempunyai beberapa keterbatasan, diantaranya: terbatasnya ruang dan waktu, mahal, tidak nyaman dan tidak efisien karena membutuhkan tenaga analis. Dengan teknologi CASA berbasis *smartphone* ini, analisis fertilitas pria dapat dilakukan sendiri di rumah (Cheon et al. 2019).

KESIMPULAN

Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa dengan CASA diantaranya: setingan CASA, semen, pengencer semen, konsentrasi spermatozoa, chamber, analisis, preparasi sampel dan waktu pelaksanaan analisis. Rekomendasi standar penilaian motilitas dengan menggunakan CASA diantaranya: analisis yang berpengalaman dan konsisten, preparasi sampel (*mixing*, *pipeting* dan *sampling*) yang tepat, konsentrasai spermatozoa 20 juta/ml, tipe chamber konsisten (dikondisikan 37°C), pengencer yang konsisten dan setingan CASA yang konsisten (frame rate 60 Hz dan *frame per field* 30) dan pelaksanaan analisis yang cepat (<2 menit). Disimpulkan selain beberapa faktor baik manusia maupun jenis alat yang berbeda yang mempengaruhi hasil analisis motilitas spermatozoa, penggunaan CASA juga memerlukan preparasi sampel termasuk

pengencer yang baik dan konsentrasi spermatozoa yang tepat.

DAFTAR PUSTAKA

- Amann RP, Waberski D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenol.* 81:5-17.
- Bruner KA, McGraw RL, Whitacre MD, Van Camp SD. 1995. Breeding soundness examination of 1.952 yearling beef bulls in North Carolina. *Theriogenol.* 44:129-145.
- Broekhuijse MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenol.* 76:1473-1486.
- Chenoweth PJ, Chase Jr CC, Larsen RE, Thatcher MJD, Bivens JF, Wilcox CJ. 1996. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. *Appl Anim Behav Sci.* 48:225-235.
- Cheon WH, Park HJ, Park MJ, Lim MY, Park JH, Kang BJ, Park NC. 2019. Validation of a smartphone-based, computer-assisted sperm analysis system compared with laboratory-based manual microscopic semen analysis and computer-assisted semen analysis. *Investig Clin Urol.* 60:380-387.
- Contri A, Valorz C, Faustini M, Wegher L and Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenol.* 74:424-435.
- Didion BA. 2008. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenol.* 70:1374-1376.
- Ducha N, Susilawati T, Wahyuningsih S. 2012. Ultrastructure and fertilizing ability of Limousin bull sperm after storage in CEP-2 extender with and without egg yolk. *Pakistan J Biol Sci.* 15:979-985.
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B, Hafez ESE, editors. *Reproductive in farm animals*. 8th ed. Philadelphia (USA): Lea & Febiger. p. 96-109.
- Gloria A, Carluccio A, Contri A, Wegher L, Valorz C. and Robbe D. 2013. The effect of the chamber on kinetic results in cryopreserved bull spermatozoa. *Androl.* 1:879-885.
- Hoogewijs MK, de Vlieghe SP, Govaere JL, de Schauwer C, de Kruif A, Van Soom A. 2012. Influence of counting chamber type on CASA outcomes of equine semen analysis. *Equine Vet J.* 44:542-549.
- Holt WV, O'Brien J, Abaigar T. 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and

- comparative research. *Reprod Fertil Develop.* 19:709-718.
- Islam MR, Husain SS, Hoque MA, Talukder MK, Rahman MS, Ali MY. 2017. Computer assisted sperm analysis of Brahman crossbred breeding bull semen. *Bang J Anim Sci.* 46:1-9.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K and Kadirvel G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. *Reprod Dom Anim.* 46:165-172.
- Lange-Consiglio A, Meucci A, Cremonesi F. 2013. Fluorescent multiple staining and CASA system to access boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extenders. *Open Vet J.* 3:21-35.
- Martinez-Pastor F, Tizado EJ, Garde J, Anel L, de Paz P. 2011. Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenol.* 75:783-795.
- Massanyi P, Chrenek P, Lukac N, Makarevich AV, Ostro A, Zivcak J, Bulla J. 2008. Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak J Anim Sci.* 41:60-66.
- Nyuwita A, Susilawati T, Isnaini N. 2015. Kualitas semen segar dan produksi semen beku sapi Simmental pada umur yang berbeda. *J Ternak Tropika.* 16:61-68.
- Parker R, Mathis C, Hawkins D. 1999. Evaluating the breeding soundness in beef bulls. Las Cruces (USA): Department of Animal and Range Sciences, New Mexico State University.
- Pagl R, Aurich JE, Muller-Schlosser F, Kankofer M dan Aurich C. 2006. Comparison of an extender containing defined milk protein fraction with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. *Theriogenol.* 66:1115-1122.
- Peng J, Wang H, Lu J, Hui W, Wang Y, Shang X. 2017. Identifying term relations cross different gene ontology categories. *BMC Bioinformatics.* 18:573.
- Perez-Shancez F, Tablado L, Yeung CH, Cooper TG, Soler C. 1996. Changes in motility patterns of spermatozoa from the rabbit epididymis as assessed by computer-aided sperm motion analysis. *Mol Reprod Develop.* 45:364-371.
- Perreault SD. 2002. Smart use of computer-aided sperm analysis (CASA) to characterize sperm motion. In: Robaire B, Hinton BT, editors. *The Epididymis from Molecule to Clinical Practise, A Comprehensive Survey of the Efferents Ducts, The Epididymis and The Vas Defference.* New York (USA): Kluwer Academy/Plenum Publishers. p. 459-472.
- Ratnawati D. 2017. Beberapa parameter motilitas spermatozoa semen cair pada tiga bangsa sapi lokal dengan tiga pengencer berbeda selama simpan dingin [Tesis]. [Malang (Indonesia)]: Universitas Brawijaya.
- Ripp S, Daumer KA, McKnight T, Levine LH, Garland JL, Simpson ML, Sayler GS. 2003. Bioluminescent bioreporter integrated-circuit sensing of microbial volatile organic compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30:636-642.
- Sarastina, Susilawati T, Ciptadi G. 2006. Analisis beberapa parameter motilitas spermatozoa pada berbagai bangsa sapi menggunakan *Computer Assisted Semen Analysis* (CASA). *J Ternak Tropika.* 6:1-12.
- Shibahara H, Obara H, Kikuchi K, Yamanaka S, Hirano Y, Suzuki Y, Takamizawa S, Suzuki M. 2003. Prediction of human sperm fertilizing ability by hyperactivated pattern. *J Mamm Ova Res.* 20:29-33.
- Syarifuddin NA, Toleng AB, Rahardja DP, Ismartoyo. 2018. Analisis semen berbasis komputerisasi (CASA) untuk memprediksi fertilitas sperma sapi Bali. Dalam: Soendjoto MA, Dharmono, Riefani MK, Ansari ML, Septiyan RA, Syahdi RN, penyunting. *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah.* Banjarmasin (Indonesia): LPPM, Universitas Lambung Mangkurat. hlm. 80-85.
- Tardiff AL, Farrel PB, Trouern-trend, Foote RH. 1996. Computer-Assisted Sperm Analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Dairy Sci.* 80:1606-1612.
- Van der Horst G. 2014. Sperm motility subpopulation and fertility. *Proceeding of 25th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction.* p. 73-77.
- Van der Horst G, Maree L and du Plessis SS. 2018. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reprod Fertility Develop.* 30:875-888.
- Vyt P, Maes, Rijsselaere T, Dejonckheere D, Castryck F, Van Soom A. 2004. Motility assessment of porcine spermatozoa: a Comparison of methods. *Reprod Dom Anim.* 39:447-453.