

## KARAKTERISTIK MORFOMETRI SPERMATOZOA MUSANG LUWAK (*PARADOXURUS HERMAPHRODITUS*) MENGGUNAKAN PEWARNAAN METHYLENE BLUE

*Morfometri Characteristics of Spermatozoa Musang Luwak (Paradoxurus Hermaphroditus)  
Using Methylene Blue Staining*

Ade Miftakhul Aziz<sup>1\*</sup>, Hanun putri nuraida<sup>1</sup>, Diana santi<sup>1</sup>, Ragil Angga Prastiya, drh.,  
M.Si<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Kedokteran Hewan FKH Universitas Airlangga Surabaya

<sup>2</sup>Dosen Departemen Reproduksi Universitas Airlangga Surabaya

\*Corresponding author: [ade.miftakhul.aziz-2017@fkh.unair.ac.id](mailto:ade.miftakhul.aziz-2017@fkh.unair.ac.id)

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik morfometri spermatozoa musang luwak *Paradoxurus hermaphroditus* sebagai salah satu acuan uji fertilitas pejantan. morfometri yang kami gunakan dalam penelitian ini menggunakan teknik pewarnaan methylene blue staining. Sembilan ekor musang luwak jantan dewasa digunakan dalam penelitian ini, spermatozoa di dapat dengan swab vagina sesaat setelah perkawinan dengan pejantan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ukuran panjang kepala spermatozoa 9.17µm, lebar kepala spermatozoa 4.49µm, area spermatozoa, 33.61µm, panjang ekor spermatozoa 60.67µm, perimeter spermatozoa 21.45µm, Ellipticity spermatozoa 2.05µm, Elongation spermatozoa 0.34 µm, roughness spermatozoa 0.91µm, Regularity 0.97µm, Panjang keseluruhan 69.83µm. kesimpulannya bahwa morfometri spermatozoa musang luwak dapat diukur menggunakan pewarnaan methylene blue dan menunjukkan hasil morfometri seperti karnivora kecil lain (kucing).

**Kata kunci:** Morfometri, Spermatozoa, Musang luwak, Methylene blue

### Abstract

This study aims to determine the morphometric characteristics of spermatozoa *Paradoxurus hermaphroditus* as a reference for male fertility testing. The morphometry that we used in this study used methylene blue staining technique. Nine adult *Paradoxurus hermaphroditus* male were used in this study, spermatozoa obtained by vaginal swab shortly after mating with males. The results showed that the length of the spermatozoa head was 9.17 µm, width of the spermatozoa head was 4.49 µm, spermatozoa area, 33.61 µm, tail length of the spermatozoa was 60.67 µm, spermatozoa parimeter 21.45 µm, spermatozoa ellipticity 2.05 µm, spermatozoa elongation 0.34 µm, spermatozoa roughness 0.97µm, Overall length 69.83µm. The conclusion is that *Paradoxurus hermaphroditus* spermatozoa morphometry can be measured using methylene blue staining and shows morphometric results like other small carnivores (cats).

**Keywords:** Morphometric, Spermatozoa, Asian palm civet, Methylene blue

### 1. PENDAHULUAN

Penurunan jumlah populasi ini mengakibatkan musang luwak terancam apabila tidak ada tindakan yang konservatif maupun pelestarian terhadap musang luwak yang akan dilakukan dengan penangkaran (Rosviani, 2018). Penangkaran satwa liar

merupakan kegiatan bertujuan untuk mengembangkan satwa liar dan tumbuhan alam dengan tujuan memperbanyak populasi agar tetap bertambah dan mempertahankan kemurnian jenis satwa liar maupun tumbuhan. Salah satu usaha yang dapat

dilakukan yaitu menjaga indikator atau penanda supaya sukses dalam tindakan kegiatan penangkaran untuk menjaga kelestarian satwa liar tersebut berkembangbiak dan menghasilkan keturunan melalui proses perkawinan (Thohari *et al.*, 2011).

Keberhasilan dalam perkawinan di suatu populasi ternak baik itu perkawinan alami maupun inseminasi buatan yang berhubungan erat dengan kualitas spermatozoa. Spermatozoa dihasilkan melalui organ reproduksi jantan yakni testis dan kelenjar-kelenjar pelengkap. Kualitas dan kuantitas pada sperma yang menurun akan memperkecil angka konsepsi yang telah dicapai (Hafez, 1993). Parameter kualitas semen dengan karakteristik morfometri pada faktor biofisiologis sangat penting dalam menentukan fertilitas pejantan (Marti dkk., 2011). Spermatozoa terdiri dari kepala leher dan ekor yang mempunyai ukuran-ukuran berbeda untuk masing-masing spesies (Gage *et al.*, 2003). Ukuran-ukuran dari spermatozoa tersebut dikenal dengan istilah morfometri spermatozoa. Penelitian mengenai morfometri spermatozoa beserta ukuran-ukuran masih jarang dilaporkan di publikasi ilmiah. Pengkajian dalam morfometri spermatozoa perlu dilakukan untuk mengetahui karakteristik ukuran-ukuran dari spermatozoa pada berbagai hewan (Gizejewski *et al.*, 2002). Morfometri dapat diaplikasikan untuk mengetahui kekerabatan suatu spesies tertentu serta diferensiasi dari berbagai spesies, varian spesies dan identifikasi pada suatu spesies (Makhzuni dkk., 2013).

Penelitian terhadap kualitas spermatozoa musang luwak menggunakan pewarnaan khusus penting dilaksanakan

untuk mengetahui kualitas spermatozoa dan meningkatkan kualitas kesehatan reproduksi musang luwak jantan untuk menghindari kepunahan. Spermatozoa terdiri atas kepala, leher dan ekor yang berbeda – beda setiap spesiesnya. Ukuran – ukuran yang meliputi pengukuran kepala, leher dan ekor disebut dengan morfometri spermatozoa. Proses pengukuran morfometri spermatozoa dibutuhkan pewarnaan khusus untuk mewarnai sel spermatozoa agar lebih mudah untuk diamati dan diukur (Gage *et al.*, 2003). Morfometri spermatozoa mengukur ukuran struktur spermatozoa dari kepala, leher dan ekor masing - masing hewan, dan berbeda pada setiap spesiesnya. Pemeriksaan morfometri pada umumnya sel spermatozoanya dalam keadaan mati dan diberi pewarna khusus sperma agar dapat membedakan strukturnya dengan mudah (Susilowati dkk., 2010). Methylene Blue merupakan salah satu zat warna yang dapat digunakan untuk mewarnai spermatozoa. Penggunaan methylene blue memberikan warna biru yang memperjelas bagian spermatozoa karena menyerap pewarna Methylene blue dengan baik (Harley and Prescott, 2002).

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas spermatozoa musang luwak dengan mengamati morfometri spermatozoa yang diwarnai dengan pewarnaan Methylene Blue. Penelitian ini penting dilaksanakan guna meningkatkan kualitas kesehatan reproduksi musang luwak jantan serta meningkatkan populasi musang luwak agar tidak punah.

## 2. MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan pada bulan oktober hingga november 2020. Penelitian

ini dilakukan di Laboratorium Instrumen Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga PSDKU Banyuwangi. Pengambilan semen dilakukan pada sembilan ekor musang luwak (*Paradoxurus hermaphroditus*) yang ada di kabupaten Banyuwangi yang berusia 1-3 tahun atau sudah dewasa kelamin. Metode pengambilan semen dilakukan dengan teknik swab pada vagina musang luwak setelah perkawinan. Teknik pewarnaan menggunakan methylene blue dan Eosin yellow (Eosin Y) dengan konsentrasi 1%. Setiap objek glass ditetesi spermatozoa musang kemudian didiamkan lima menit. Setelah itu direndam dalam aquades lima menit, dilanjutkan direndam dalam Eosin Y 1% selama lima menit, selanjutnya direndam dalam aquades selama lima menit, dilanjut dengan direndam dengan methylene blue 1% selama lima menit dan yang terakhir direndam dengan aquades selama lima menit. Preparat diangkat dan dikeringanginkan, kemudian dilakukan pengamatan dibawah mikroskop trinokuler Nikon Eclipse E200 dengan perbesaran 400x. Pengukuran morfometri spermatozoa dilakukan dengan bantuan aplikasi NIS Elements D. Data morfometri pada penelitian ini disajikan dalam bentuk deskriptif

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengambilan spermatozoa dilakukan dengan swab vagina sebanyak sembilan kali pada sembilan musang luwak betina yang telah melakukan perkawinan. Didapati hasil sejumlah 100 spermatozoa dari sembilan preparat yang telah diwarnai dengan pewarnaan Methylene blue. Pengamatan dan pengukuran morfometri spermatozoa dilakukan dengan mikroskop trinokuler menggunakan aplikasi NIS

Elements D. Terlihat spermatozoa terwarnai biru dengan ekor berwarna lebih gelap dibandingkan dengan kepala, untuk latar belakang pada pewarnaan ini tidak terwarnai (**Gambar 1**).



**Gambar 1.** Morfologi Spermatozoa Musang Luwak dengan Pewarnaan Methylene Blue pembesaran 400x

Pada penelitian sebelumnya ekor spermatozoa banyak ditemukan kerusakan dengan pengamatan menggunakan pewarnaan brom fenol blue, penelitian yang sama menunjukkan pewarnaan yang sama eosin negrosin mengakibatkan alterasi ekor spermatozoa (Oliveira *et al.* 2009). Ini membuktikan bahwa pewarnaan spermatozoa dan teknik labeling dapat mendeteksi kejadian kecacatan pada ekor spermatozoa (Villa verde *et al.* 2008). Teknik fiksasi spermatozoa ketika membuat preparat ulas tipis juga memungkinkan perbedaan ukuran spermatozoa fiksasi paling bagus menggunakan larutan formaldehid salin (streit-jr *et al.* 2004).

Penelitian tentang peningkatan protokol pemeriksaan spermatozoa dengan teknik pewarnaan banyak di deskripsikan oleh para peneliti sebelumnya seperti pengamatan morfometri kucing serta penelitian pada babi bengal (Galfani *et al.* 2000). menunjukkan pewarnaan methylene blue dan eosin negrosin sebagai

pengamatan spermatozoa pada kucing pewarnaan fast green menunjukkan hasil yang bagus pada kambing pewarnaan brom fenol blue merupakan yang paling efisien dan sering digunakan. Pewarnaan spermatozoa pada penelitian ini menunjukkan latar belakang warna cukup jernih dan sedikit terdapat artefak sehingga lebih mudah dilihat dan diukur.

Pengukuran morfometri spermatozoa meliputi panjang kepala, lebar kepala, luas kepala, ekor. Kemudian menghitung panjang keseluruhan, perimeter, ellipticity, elongation,

roughness, dan regularity dengan rumus yang telah ditentukan pada 100 spermatozoa. Hasil pengukuran morfometri spermatozoa musang luwak yang didapat dari penelitian ini adalah Panjang kepala spermatozoa dengan rata-rata bahwa ukuran L  $9.17 \mu\text{m} \pm 0.41 \mu\text{m}$ , W  $4.50 \mu\text{m} \pm 0.41 \mu\text{m}$ , A  $33.61 \mu\text{m} \pm 3.73 \mu\text{m}$ , TL  $60.67 \mu\text{m} \pm 1.50 \mu\text{m}$ , P  $21.45 \mu\text{m} \pm 0.96 \mu\text{m}$ , Ellipticity  $2.05 \pm 0.21$ , Elongation  $0.34 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$ , Roughness  $0.91 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$ , Regularity  $0.97 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$ , Total L  $68.84 \mu\text{m} \pm 1.25 \mu\text{m}$  yang disajikan pada (Tabel 3.1)

**Tabel 1.** Morfometri Spermatozoa Musang Luwak (Rata-rata Standar deviasi)

Musang Jantan	Jumlah Pengamatan	Hasil pengamatan (Rata-rata ± Standar deviasi)									
		L	W	A	TL	P	Ellipticity	Elogation	Roughness	Regularity	Total L
1	10	8.85 ± 0.41	4.09 ± 0.41	28.27 ± 3.73	61.35 ± 1.50	20.31 ± 0.96	2.18 ± 0.21	0.37 ± 0.04	0.86 ± 0.04	1.01 ± 0.04	70.20 ± 1.25
2	10	9.20 ± 0.39	4.34 ± 0.40	30.94 ± 3.85	61.04 ± 1.28	21.25 ± 0.85	2.14 ± 0.22	0.36 ± 0.04	0.86 ± 0.05	1.02 ± 0.05	70.24 ± 1.30
3	12	9.14 ± 0.47	4.59 ± 0.36	33.33 ± 4.42	60.84 ± 2.51	21.56 ± 1.08	2.00 ± 0.15	0.33 ± 0.03	0.90 ± 0.06	0.99 ± 0.07	69.98 ± 2.69
4	12	9.02 ± 0.41	4.56 ± 0.27	32.08 ± 3.41	61.41 ± 1.82	21.31 ± 0.86	1.98 ± 0.12	0.33 ± 0.03	0.89 ± 0.07	1.01 ± 0.07	70.43 ± 1.99
5	12	9.14 ± 0.49	4.33 ± 0.48	33.20 ± 4.40	60.99 ± 1.54	21.15 ± 1.38	2.13 ± 0.19	0.36 ± 0.05	0.93 ± 0.07	0.94 ± 0.09	70.13 ± 1.54
6	10	9.02 ± 0.45	4.54 ± 0.28	34.65 ± 2.54	59.66 ± 6.61	21.29 ± 0.72	2.00 ± 0.18	0.33 ± 0.04	0.96 ± 0.05	0.93 ± 0.04	68.67 ± 6.76
7	12	8.95 ± 0.59	4.40 ± 0.42	32.91 ± 4.75	61.04 ± 0.79	20.96 ± 1.43	2.05 ± 0.16	0.34 ± 0.03	0.94 ± 0.09	0.94 ± 0.09	69.99 ± 1.10
8	12	09.46 ± .41	4.78 ± 0.28	36.61 ± 4.52	60.37 ± 2.18	22.35 ± 0.61	1.99 ± 0.16	0.33 ± 0.04	0.92 ± 0.08	0.97 ± 0.08	69.82 ± 2.15
9	10	9.54 ± 0.54	4.87 ± 0.48	39.19 ± 5.49	60.23 ± 1.32	22.62 ± 1.12	1.98 ± 0.22	0.33 ± 0.05	0.96 ± 0.12	0.94 ± 0.13	69.77 ± 1.45
<b>Rata-rata Total</b>	100	9.17 ± 0.41	4.50 ± 0.41	33.6 ± 3.73	60.67±1.50	21.45 ± 0.96	2.05 ± 0.21	0.34 ± 0.04	0.91 ± 0.04	0.97 ± 0.04	69.84 ± 1.25

Pengetahuan dan penelitian mengenai morfometri mulai dari kepala dan leher spermatozoa merupakan informasi

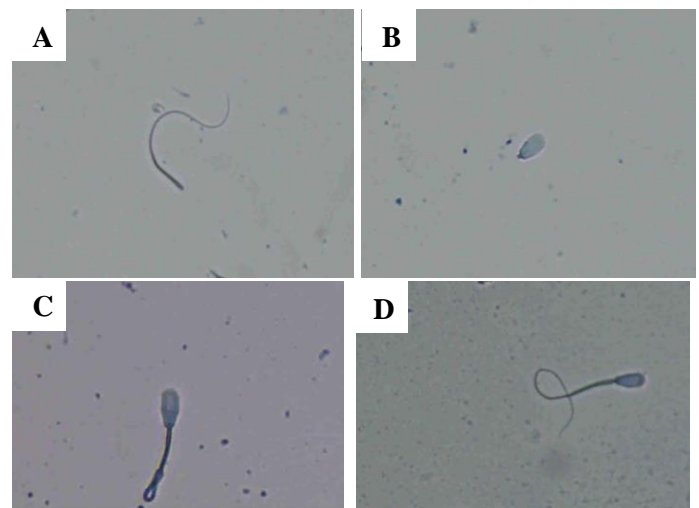
penting tentang adaptasi dan fungsi dari spermatozoa yang kemungkinan berbeda setiap spesies. Variasi ukuran dan bentuk dari spermatozoa mungkin berhubungan

dengan kapasitas fertilisasi dan juga tingkat kematangan spermatozoa faktor eksternal seperti lingkungan, pestisida dan makanan yang mengandung toksin juga dapat merubah bentuk spermatozoa terutama bentuk kepala dan integritas membran (Santiago-moreno *et al.* 2016). Kompetisi seksual pada karnivor seperti poligami dan monogami juga akan mempengaruhi fungsi dari karakter spermatozoa pada hewan yang poligini ejakulat spermatozoa mempunyai konsentrasi yang sangat tinggi, konsentrasi spermatozoa motilitas dan abnormalitas sedangkan pada hewan monogami mempunyai ejakulat yang cenderung rendah konsentrasinya pada penelitian ini kami mencoba mengukur morfometri spermatozoa musang luwak yang belum pernah dilakukan. penelitian ini sebelumnya sebagai acuan atau standar ukuran morfometri normal spermatozoa normal untuk penelitian selanjutnya.

Dari hasil penelitian kami rerata jenis dan ukuran morfometrik mulai dari panjang sampai rounes ukurannya kurang lebih sama seperti karnivora lain seperti kucing. Hal ini sesuai dengan penelitian ini sebelumnya yang menyatakan musang luwak termasuk jenis karnivor kecil (streit-jr *et al.* 2004). Faktor eksternal yang dapat mempengaruhi morfologi spermatozoa seperti toksin dan polutan bisa menyebabkan proses spermatogenesis berjalan dengan baik secara periodik sehingga akan meningkatkan abnormalitas ukuran spermatozoa (Oliveira *et al.* 2009).

Berbagai jenis abnormalitas spermatozoa ditemukan dalam penelitian ini, diantaranya ditemukan spermatozoa yang tidak memiliki kepala (*headless*), kelainan berupa patah atau lepasnya kepala dari bagian leher dan ekor (*detached head*),

Ekor Spermatozoa terlipat, melingkar, dan patah pada beberapa bagian (*dag defect*), bentuk dari ujung ekor spermatozoa menggulung (*coiled tail*) seperti yang disajikan pada (**Gambar 2.**). Kelainan tersebut dapat disebabkan oleh degenerasi testis atau peradangan pada ampula dan epididimis, hipoplasia testicular, dan faktor genetik (McGowan *et al.*,1995)



**Gambar 2.** a) *Headless*, b) *Detached dead*, c) *Shaped pear*, d) Ekor terlipat, melingkar dan patah, e) *coiled tail*.

#### 4. KESIMPULAN

Hasil dari penelitian morfometri spermatozoa musang luwak, memiliki abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas yang banyak ditemukan adalah *Headless*, *Detached dead*, *Shaped pear*, Ekor terlipat, melingkar, dan patah serta *coiled tail*. Abnormalitas yang tinggi dapat mempengaruhi fertilitas. Teknik pewarnaan Methylene Blue menghasilkan gambaran morfometri spermatozoa musang luwak yang jelas dan spermatozoa akan terwarnai biru dengan ekor berwarna lebih gelap dibandingkan dengan kepala, untuk latar belakang pada pewarnaan ini tidak terwarnai. Pengukuran pada spermatozoa

musang luwak diperoleh morfometri spermatozoa dengan Panjang kepala spermatozoa dengan rata-rata bahwa ukuran  $L 9.17 \mu\text{m} \pm 0.41 \mu\text{m}$ ,  $W 4.50 \mu\text{m} \pm 0.41 \mu\text{m}$ ,  $A 33.61 \mu\text{m} \pm 3.73 \mu\text{m}$ ,  $TL 60.67 \mu\text{m} \pm 1.50 \mu\text{m}$ ,  $P 21.45 \mu\text{m} \pm 0.96 \mu\text{m}$ , Ellipticity  $2.05 \pm 0.21$ , Elongation  $0.34 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$ , Roughness  $0.91 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$ , Regularity  $0.97 \mu\text{m} \pm 0.04 \mu\text{m}$ , Total L  $68.84 \mu\text{m} \pm 1.25 \mu\text{m}$ .

#### DAFTAR PUSTAKA

- de Oliveira, R. V., Nunes, J. F., de Mello Salgueiro, C. C., Cavalcante, J. M. M., de Araripe Moura, A. A., et al. (2009). Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio a base de água de coco em pó (acp-101) ou tris, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. *Ciência Animal Brasileira*, 10(3), 862-869.
- Gage, M.J.G. and R. Freckleton. (2003). Relative Testis Size and Sperm Morphometry Across Mammals: No Evidence for an Association Between Sperm Competition and Sperm Length. *Biology Science* 270: 625-632.
- Galvani, F., Costa, E., Torres, C., Bruschi, J., Santos, M., & Pinheiro, R. (2000). Perímetro escrotal, características físicas do sêmen e morfológicas do espermatozoides de touros Nelore de alta libido comparados com animais de libido inferior. *Ars Veterinária*, 16, 97-103.
- Gizejewski, Z., W. Marta and P. 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* : 244-251.
- Hafez, E.S.E. (1993). *Reproduction in farm animals*. 6th ed. Philadelphia : Lea & Fibiger,
- Harley, J.P., Prescott, L.M. (2002). *Laboratory exercises in microbiology*. Fifth Edition. The McGraw-Hill Companies.
- Makhzuni, R., Syaifullah, dan Dahelmi. (2013). Variasi morfometri papilio polytes l. (lepidoptera : papilionidae) di beberapa lokasi di Sumatera Barat.
- McGowan M, Galloway D, Taylor E, Entwistle K, and Johnston P. (1995). *Veterinarians examination of bulls*. Queensland : Australia Association of Cattle Veterinarians.
- Rosviani, Larasati. (2018). manajemen penangkapan rusa timor (*Rusa timorensis*) di taman rusa bumi putra, indramayu, jawa barat. Bogor : Fakultas kehutanan institut pertanian bogor.
- Santiago-Moreno, J., Estes, M. C., Villaverde-Morcillo, S., Toledano-Díaz, A., Castaño, C., et al. (2016). Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies. *Asian Journal of Andrology*, 18(6), 882.
- Streit Jr, D. P., de Moraes, G. V., Ribeiro, R. P., Povh, J. A., de Souza, E. D., et al. (2004). Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 7(2).
- Susilowati, S. Hardijanto., T.W. Suprayogi., T. Sardjito., dan T. Hernawati. (2010). Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. 11- 24, 29-30.
- Thohari M, Masyud M, Takandjandji M. (2011). Teknis Penangkaran rusa timor (*Cervus timorensis*) untuk stok perburun. Makalah yang disampaikan pada Seminar Sehari Prospek

Penangkaran Rusa Timor (*Cervus timorensis*) sebagai Stok Perburuan.  
IPB International Convention Center,  
14 April 2011.

Villaverde, A. I. S. B., Melo, C. M.,  
Corrente, J. E., Papa, F. O., & Lopes,  
M. D. (2008). Comparação Entre  
Dois Métodos De Coloração Para  
Análise Morfológica E Acrossomal  
De Espermatozóides De Gato  
Doméstico (*Felis catus*). *Ciência  
Animal Brasileira*, 9(3), 686-692.