

PENYIMPANAN SPERMATOZOA PADA SUHU PRESERVASI DAN BERBAGAI PENGECER SEMEN TERHADAP DAYA TAHAN HIDUP SPERMATOZOA

Desy Septiani¹, E. Mulyati Effendi², Moerfiah³

¹Puslit Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

^{2,3}Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Pakuan, Bogor

email : desyseptiani30@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this research is to know the quality of diluent which is stored at room temperature and temperature of preservation to survival of spermatozoa, to know the temperature of cement storage to survival of spermatozoa and to know the type of cement diluent material to survival of spermatozoa. The study used local sheep cement. The design used was Randomized Block Design (RAK) Factorial pattern with 2 treatment of storage temperature ie S1 = room temperature; S2 = preservation temperature; and with 4 diluent treatment: P1 = yolk citrate; P2 = skim milk; P3 = liquid milk; P4 = tris of soybeans. The observed variables were the macroscopic and microscopic cement quality prior to dilution, the progressive movement of sperm from each diluent and the progressive movement of sperm at each storage temperature. The administration of yolk citrate diluents affects the survival of spermatozoa compared with other diluents ($P > 0.05$). The preservation temperature gives optimum results in suppressing the rate of decline in survival of spermatozoa ($P < 0.05$). Giving yolk citrate stored at a preservation temperature is apparent in maintaining the survival of spermatozoa with 55% motility for three days.

Keywords: *survival, spermatozoa, cement diluents, storage temperature*

PENDAHULUAN

Berbagai upaya dilakukan untuk melindungi satwa, secara garis besar terdapat dua pendekatan yang dilakukan, yang pertama ialah melalui konservasi secara *in-situ* dengan melindungi habitatnya dan pendekatan yang kedua adalah secara *ex-situ* melalui usaha pemeliharaan dan pengembangbiakan satwa. Salah satu upaya untuk meningkatkan potensi suatu hewan adalah melalui penerapan teknologi inseminasi buatan (IB). IB dilakukan melalui proses penampungan semen, penilaian, pengenceran dan penyimpanan semen (Preservasi). Teknologi ini dapat menjadi model konservasi terhadap hewan-hewan langka, buas atau liar yang sedang ditangkarkan tetapi tidak dapat kawin secara normal yang disebabkan oleh berbagai faktor. Akan tetapi untuk dapat melakukan IB pada hewan liar tidak mudah. Menurut UU No. 18 tahun 2009

tentang peternakan dan kesehatan hewan pasal 27 ayat 4 menyatakan pemanfaatan sumber daya genetik hewan asal satwa liar mengikuti peraturan perundang-undangan di bidang konservasi sumber daya alam hayati dan ekosistemnya. Untuk itu diperlukan suatu objek yang dapat dipergunakan sebagai objek penelitian, yaitu dengan mempergunakan hewan percobaan.

Domba lokal merupakan salah satu ternak yang potensial untuk dikembangkan menjadi bibit yang unggul dan mempunyai peran penting dalam menyediakan swasembada daging secara nasional dan meningkatkan pendapatan petani ternak sehingga populasi dan produksinya perlu diperhatikan (Rudiah, 2008).

Program IB akan berhasil dengan baik apabila sperma diproduksi dengan jumlah dan kualitas yang baik (Toelihere, 1985). Penambahan bahan pengencer bertujuan untuk menyediakan sumber

energi bagi sperma selama penyimpanan (preservasi). Syarat penting bahan pengencer sperma adalah mampu menyediakan bahan makanan spermatozoa untuk proses metabolisme aerob dan anaerob, memberikan imbalan unsur mineral, memiliki lipoprotein atau lesitin untuk melindungi terhadap kejutan dingin, menjaga pH dan tekanan osmotik yang sama dengan sperma (Salisbury dan VanDemark, 1985).

Beberapa bahan pengencer sudah banyak digunakan untuk meningkatkan daya tahan hidup spermatozoa. Sitrat kuning telur digunakan sebagai media hidup sel spermatozoa, karena semen itu sendiri mengandung sitrat natricus yang merupakan penyanggah bersifat isotonis, berguna bagi metabolisme sel dan sebagai *buffer* dalam mempertahankan pH (Foote, 1978 dalam Herdiawan (2004). Sebagaimana diketahui susu skim dan susu cair mengandung zat nutrisi yang dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dan memelihara kelangsungan hidup spermatozoa (Salisbury dan VanDemark, 1985). Kacang kedelai menjadi bahan pengencer alternatif karena mengandung lesitin nabati yang bersifat membran *coating* untuk tetap mempertahankan konfigurasi normal *phospholipid bilayer* yang merupakan susunan utama membran spermatozoa (Aires *et al.*, 2003).

BAHAN DAN METODE

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan, thermometer, tabung penampung semen, tabung efendorf, haemocytometer, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, *hotplate*, *stirrer*, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, timbangan analitik, kertas saring, kertas tissue, lemari pendingin. Bahan yang digunakan adalah asam sitrat monohidrat, *tris* (*hidroksimetil aminometan*), aquadest, kuning telur, susu skim, susu cair UHT (merk ultramilk),

kacang kedelai, NaCl fisiologis, fruktosa, antibiotik streptomisin dan penisilin, pewarna eosin negrosin dan alkohol.

Penampungan Semen

Sebelum melakukan penampungan, alat-alat yang akan digunakan dipersiapkan dan dicuci bersih dan disterilisasi menggunakan oven dengan suhu 170° C. Selanjutnya bahan-bahan pengencer ditimbang sesuai komposisinya masing-masing di dalam pengencer. Bahan pengencer dibuat satu hari sebelum penampungan dan disimpan di dalam lemari es.

Penampungan semen dilakukan pada pagi hari sebanyak tiga kali. Semen ditampung menggunakan vagina buatan dengan bantuan hewan betina pemancing. Semen yang ditampung sebanyak tiga kali dari tiga domba jantan kemudian dicampur menjadi satu.

Evaluasi Semen

Pemeriksaan semen dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik untuk menentukan kelayakan penggunaannya. Penilaian semen menurut Afriantini (2012) adalah sebagai berikut: Evaluasi semen secara makroskopik dilakukan sebagai berikut : a). **Volume semen**; volume semen yang diejakulasi langsung terbaca pada tabung penampung berskala dan dinyatakan dalam mL/ejakulasi. b). **Warna**; penilaian warna semen dilakukan dengan melihat langsung semen yang ditampung. c) **Konsistensi**; konsistensi dari semen dapat diperiksa dengan cara memiringkan tabung yang berisi sperma secara perlahan-lahan. Semen yang baik derajat kekentalannya akan bergerak sangat lambat mengikuti kemiringan tabung penampung dimana hampir semua atau sedikit lebih kental dari susu. d). **pH** (derajat keasaman) semen; penilaian pH semen dapat dilakukan dengan menggunakan *indicator* pH atau dengan menggunakan pH meter.

Evaluasi secara mikroskopik dilakukan sebagai berikut : a). **Gerakan massa**; penilaiannya meliputi, (1) melihat tebal tipisnya gelombang massa spermatozoa dan (2) kecepatan gelombang spermatozoa berpindah tempat. Nilai pergerakan massa ditentukan dengan skala +++/++/+/-. b). **Gerakan individu/motilitas**; penilaian gerakan spermatozoa secara individual, baik kecepatan atau perbandingan antara yang bergerak aktif progresif dengan gerakan-gerakan spermatozoa yang lainnya. Penilaian umumnya dilakukan secara subjektif, dengan membagi kecepatan melalui penilaian skor. c). **Konsentrasi sperma**; diamati menggunakan haemocytometer Neubauer, konsentrasi spermatozoa merupakan jumlah spermatozoa yang terkandung dalam setiap millimeter semen. Perhitungan dilakukan dari 5 kotak besar dalam kotak hitung haemocytometer secara sistematis, masing-masing pada random atau secara diagonal. Untuk menghitung jumlah spermatozoa per mL dalam ejakulat, perhitungannya menggunakan rumus

$$\text{Jumlah spermatozoa/ mL} = N \times 5 \times F \times P \times 10.000.$$

d). **Persentase hidup dan spermatozoa abnormal**; evaluasi dilakukan dengan menggunakan pewarnaan eosin. Persentase sperma yang hidup ditentukan dengan rumus :

$$\text{Persentase spermatozoa hidup} = \frac{\text{jumlah sperma hidup}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100\%$$

Pengenceran dan Penyimpanan Semen

Semen yang mempunyai kualitas yang baik dibagi menjadi empat bagian dengan volume yang sama. Bahan-bahan pengencer yang digunakan yaitu sitrat kuning telur, susu skim, susu cair dan tri sari kedelai. Pengenceran dilakukan dalam tabung Erlenmeyer dengan memasukkan

semen segar ke dalam larutan pengencer dimana jumlah pengencer yang digunakan tergantung dari konsentrasi dan motilitas spermatozoa yang dibagi dengan dosis IB (semen cair domba 100 juta/mL), volume total akan didapatkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\% \text{ motilitas} \times \text{konsentrasi} \times \text{v. semen}}{\text{Dosis IB}} \times \text{v. IB}$$

Volume bahan pengencer akan didapatkan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Volume total} - \text{volume semen}$$

Sedangkan komposisi bahan pengencer dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1. Komposisi Bahan Pengencer

Komposisi	Bahan Pengencer			
	P1	P2	P3	P4
Tris	-	-	-	2.42 g
As. Sirat	2.9 g	-	-	1.36 g
Fruktosa	0.88 g	-	-	0.88 g
Kuning telur	20 mL	-	-	-
Susu skim	-	50 g	-	-
Susu cair	-	-	250	-
Kedelai	-	-	-	25 g
Aquadestilata	100 mL	250 mL	-	250 mL
Penicillin	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
streptomycin	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL

Keterangan : P1= Sitrat kuning telur; P2= Susu skim; P3= Susu cair; P4= Tris sari kedelai

Setelah semen dinilai dan diencerkan, semen disimpan pada suhu ruang (27°-30°C) dan suhu preservasi (3°-5°C).

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kualitas semen secara makroskopik dan mikroskopik, gerakan progresif sperma dari setiap bahan pengencer dan gerakan progresif sperma pada setiap suhu penyimpanan.

Penelitian ini dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola Faktorial 2x4 dengan tiga kali ulangan perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

Semen segar merupakan semen yang didapat segera setelah penampungan. Semen domba hasil penampungan segera dievaluasi agar diketahui kualitas dan kelayakannya untuk dapat diolah lebih lanjut. Evaluasi terhadap semen segar domba lokal hasil penampungan selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kualitas Semen Segar Domba Lokal.

Karakteristik Kualitas	Penampungan ke-			Rataan ± SD
	1	2	3	
Volume ejakulat dari tiga ekor domba (mL)	1.1	1.8	1.5	1.47 ±0.35
Nilai rata-rata Volume semen/ekor (mL)	0.37	0.6	0.5	0.49 ±0.16
pH	6.5	6.7	6.5	6.5 ±0.11
Warna	Krem	Krem keruh	Krem	Krem
Konsistensi	Kental	Agak kental	Kental	Kental
Gerakan massa	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
Motilitas (%)	80%	75%	80%	78.33 ±0.02
Konsentrasi (juta spermatozoa/mL)	2.135	1.255	1.365	1.585 ±0.48
Viabilitas (%)	77	82.4%	79.3%	79.5% ±43.98
Abnormalitas (%)	7%	5%	5%	5.6 ±0.01

Hasil evaluasi semen segar ini telah memenuhi persyaratan minimal yang diperlukan untuk proses pengenceran dan dilakukan pendinginan dengan menyimpan pada suhu ruang (27°-30°C) dan suhu preservasi (3°-5°C) untuk diketahui kualitas dan daya tahan hidupnya. Rataan volume awal semen dari satu ekor domba adalah berkisar antara 0.33-0.65 mL, nilai derajat keasaman (pH) semen dari ketiga ulangan berkisar antara 6.39-6.6, rata-rata konsentrasi spermatozoa yang didapatkan dari sembilan ejakulat domba lokal tersebut adalah 1.585 juta/mL, rata-rata gerakan motilitas progresif spermatozoa adalah sebesar 78.33% ± 0.02, persentase hidup

spermatozoa dari penelitian ini adalah 79.5% dan persentase abnormalitas spermatozoa yang didapatkan pada semen segar domba lokal dalam penelitian ini sebesar 5.6% ± 0.01.

Daya Tahan Hidup Spermatozoa setelah Perlakuan

Daya tahan hidup spermatozoa yang dimaksud adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama penyimpanan yang diperlihatkan melalui sanggunya bergerak progresif. Namun daya tahan hidup spermatozoa yang diamati dalam penelitian ini adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama motilitas spermatozoa tersebut masih berada di atas motilitas spermatozoa yang layak untuk inseminasi buatan, yakni lebih dari 50% gerakan progresif atau maju ke depan. Sedangkan persentase hidup di bawah 50% tidak lagi dilakukan pengamatan.

Evaluasi daya tahan hidup spermatozoa dari pengaruh perlakuan suhu diamati setiap harinya dengan 10 kali pengamatan. Nilai rata-rata gerakan progresif spermatozoa setelah dilakukan pengenceran dengan beberapa bahan pengencer dan disimpan pada dua suhu penyimpanan, Data tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Daya Tahan Hidup Spermatozoa dalam Kombinasi Perlakuan.

Kombinasi Perlakuan	Hari ke-			Total	Rataan
	1	2	3		
P1S1	72	58	48	178	59.33 ^b
P2S1	67	55	0	122	40.67 ^{ab}
P3S1	60	55	0	115	38.33 ^{ab}
P4S1	58	35	0	93	31.00 ^a
P1S2	80	70	55	205	68.33 ^b
P2S2	67	58	42	167	55.67 ^{ab}
P3S2	73	60	50	183	61.00 ^b
P4S2	62	33	0	95	31.67 ^a
Total	539	424	195	1158	

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0.05). (P1= Pengencer sitrat kuning telur; P2= Pengencer susu skim; P3= Pengencer susu cair; P4= Pengencer tris sari

Penyimpanan Spermatozoa Pada Suhu Preservasi(Desy Septiani, dkk)

kedelai; S1= Penyimpanan suhu ruang; S2= Penyimpanan suhu preservasi).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum penambahan sitrat kuning telur (P1) yang disimpan pada suhu preservasi (S2) mampu memperpanjang daya tahan hidup spermatozoa selama tiga hari dengan persentase gerakan progresif spermatozoa yaitu sebesar 55% dibanding dengan kombinasi perlakuan yang lainnya. Dengan demikian, pengenceran semen dengan menggunakan bahan pengencer sitrat kuning telur yang disimpan pada suhu preservasi (3°-5° C) dapat digunakan untuk program inseminasi buatan karena nilai gerakan motilitas progresif spermatozoanya masih lebih besar dari 50%. Sedangkan pengenceran semen dengan bahan pengencer lainnya hanya bertahan pada hari kedua (P2S1 55% P; P3S1 55% P dan P2S2 58% P) yang masih dapat digunakan untuk IB. Sedangkan untuk kombinasi perlakuan P4S1 dan P4S2, spermatozoa hanya bertahan selama satu hari saja.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perlakuan bahan pengencer dan suhu penyimpanan, masing – masing memperlihatkan pengaruh perbedaan yang tidak nyata ($P > 0.05$) terhadap daya tahan hidup spermatozoa. Namun, bila dilihat pada Tabel 9, bahwa penambahan bahan pengencer sitrat kuning telur (P1) memperlihatkan pergerakan progresif spermatozoa lebih tinggi dari bahan pengencer lainnya yaitu sebesar 63.83%. Demikian juga pengaruh suhu penyimpanan preservasi (S2) lebih baik dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa, yang diperlihatkan dengan gerakan motilitas progresif spermatozoa yaitu sebesar 54.17%. Untuk melihat pengaruh antar perlakuan pengencer dan antar perlakuan suhu penyimpanan maka pengujian dilanjutkan dengan menggunakan uji Duncant.

Dari hasil uji Duncant, menunjukkan bahwa perlakuan bahan

pengencer P1 tidak berbeda nyata dengan bahan pengencer P2, P3 dan P4 dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa. Demikian pula dengan perlakuan suhu penyimpanan, perlakuan suhu penyimpanan menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dimana penyimpanan pada suhu S2 nyata dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa. Data tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh Bahan Pengencer dan Suhu Penyimpanan terhadap Rataan Motilitas Progresif Spermaozoa selama Tiga Hari.

Suhu	Bahan Pengencer				Rataan
	P1	P2	P3	P4	
S1	59.33	40.67	38.33	31	42.33 ^a
S2	68.33	55.67	61	31.67	54.17^b
Rataan	63.33^a	48.17 ^a	49.66 ^a	31.33 ^a	

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Kombinasi perlakuan penambahan bahan pengencer pada suhu penyimpanan memperlihatkan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$) terhadap ketahanan hidup spermatozoa. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 3 yang menunjukkan bahwa nilai rataan pemberian bahan pengencer sitrat kuning telur (P1) yang disimpan pada suhu preservasi (S2) memperlihatkan daya tahan hidup spermatozoa yang lebih lama (tiga hari) dengan gerakan motilitas progresif spermatozoa sebesar 55%. Hal ini memberikan indikasi bahwa kuning telur yang memiliki kandungan lipoprotein dan lesitin memegang peranan yang penting dalam melindungi spermatozoa terhadap pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) dan dengan penambahan natrium sitrat berfungsi sebagai buffer untuk mengatasi peningkatan pH. Selain itu juga terdapat fruktosa yang berfungsi sebagai cadangan energi yang sangat dibutuhkan dalam proses metabolisme sehingga daya tahan spermatozoa dalam pengencer ini lebih baik dibandingkan dengan pengencer lain.

Namun, bila dilihat pada Tabel 4 spermatozoa yang telah diencerkan yang disimpan pada suhu preservasi ketahanan hidup spermatozoanya lebih lama bila dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu ruang. Hal ini disebabkan karena pada suhu 3^o-5^oC kecepatan metabolisme dan motilitas spermatozoa akan menurun. Sedangkan cepatnya penurunan motilitas pada suhu ruang disebabkan karena pada suhu ruang metabolisme berlangsung cepat sehingga perombakan glukosa dan fruktosa yang dibutuhkan sebagai sumber energi untuk pergerakan spermatozoa cepat habis dan hasil sampingan dari metabolisme ini adalah asam laktat yang dapat meningkatkan pH pengencer. Hal ini sesuai dengan pendapat Bearden dan Fuquay (2000).

Rendahnya persentase spermatozoa hidup pada pengencer susu skim dan susu cair kemungkinan disebabkan karena pemanasan yang kurang sempurna atau belum mencapai suhu 98^o C sehingga menyebabkan spermatozoa mati dalam waktu dua sampai tiga hari. Susu cair yang dipakai mempunyai kandungan lemak tinggi yaitu 13%, ini menjadikan gerakan spermatozoa terhambat. Salisbury dan Van Demark (1985) mengemukakan bahwa kecepatan gerak spermatozoa dipengaruhi oleh konsentrasi spermatozoa, umur spermatozoa, dan tingkat viskositas media pengencer. Pengencer tris sari kedelai memberikan ketahanan hidup spermatozoa yang paling kecil dengan pengencer lainnya. Hal ini diduga disebabkan pH pada pengencer tris sari kedelai terlalu basa (pH 8) diakibatkan pemanasan sari kedelai yang kurang sempurna.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa : Pemberian pengencer sitrat kuning telur memberikan hasil yang efektif dibandingkan dengan pengencer susu skim, susu cair dan tris sari kedelai dalam memperpanjang daya tahan hidup,

walaupun pengaruhnya tidak nyata. Suhu preservasi 3^o – 5^o C memberikan hasil yang optimum dalam menekan laju penurunan daya tahan spermatozoa yang diencerkan dalam berbagai bahan pengencer, walaupun pengaruhnya nyata. Pemberian bahan pengencer sitrat kuning telur yang disimpan pada suhu preservasi, nyata dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa dengan gerakan motilitas progresif sebesar 55% pada hari ketiga, sehingga masih layak untuk digunakan inseminasi buatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aires V.A., K.D. Hinsch, F.M. Schloesser, F.M. Schloesser, K. Bogner, S.M. Schloesser and E. Hinsch, 2003. *In vitro* and *in vivo* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60(2): 269-279.
- Afriantini, R. I. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. Institut Pertanian Bogor Press. Bogor
- Bearden, H.J. dan J.W. Fuquay. 2000. *Applied Animal Reproduction*. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. pp: 158–171.
- Herdiawan. 2004. *Pengaruh Laju Penurunan Suhu dan Jenis Pengencer terhadap Kualitas Semen Beku Domba Priangan*. JITV Vol. 9 No 2 Th. 2004
- Rudiah. 2008. *Pengaruh Metode Perkawinan Terhadap Keberhasilan Kebuntingan Domba Lokal Palu*. J. Agroland 15(3) : 236 – 240.
- Toelihere, M.R. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa Bandung.
- Salisbury, G. W. Dan N. L. VanDemark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Terjemahan R. Djanuar. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.