



PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

**DAYA TAHAN SPERMATOZOA SAPI *FRISIEN HOLSTEIN* DALAM
BERBAGAI BAHAN PENGECER PADA SUHU 5°C**

**BIDANG KEGIATAN :
PKM-AI**

Diusulkan oleh :

Indra Bagus Priastomo	B04062716 / 2006
Candrani Khoirinaya	B04063491 / 2006
Rico Juni Artanto	B04063247 / 2006
Andrini Aditya Wardani	B04070173 / 2007

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

2009

LEMBAR PENGESAHAN

1. Judul Kegiatan : Daya Tahan Spermatozoa Sapi *Frisien Holstein* dalam Berbagai Bahan Pengencer pada Suhu 5°C
2. Bidang Kegiatan : ()PKM-AI ()PKM-GT
3. Ketua Pelaksana Kegiatan

4. Anggota Pelaksana Kegiatan/Penulis : 3 orang
5. Dosen Pendamping

Bogor, 7 April 2009

Menyetujui
Wakil Dekan
Fakultas Kedokteran Hewan IPB

Ketua Pelaksana Kegiatan

(Dr. Nastiti Kusumorini)
NIP. 131669942

(Indra Bagus Priastomo)
NIM. B04062761

Wakil Rektor I
Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

Dosen Pendamping

(Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS)
NIP. 131473999

(Dr. Dra. R. Iis Arifianti, M. Si)
NIP. 130914666

DAYA TAHAN SPERMATOZOA SAPI *FRISIEN HOLSTEIN* DALAM BERBAGAI BAHAN PENGENCER PADA SUHU 5°C

Priastomo IB, Artanto RJ, Khoirinaya C, Wardani AA
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
ch_nguk@yahoo.com

Abstrak

Inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu teknologi reproduksi untuk meningkatkan populasi dan mutu genetik dari ternak. Keberhasilan IB ditentukan oleh berbagai faktor diantaranya adalah kualitas semen yang diinseminasikan. Kualitas semen cair ditentukan oleh bahan pengencer yang digunakan. Penelitian ini bertujuan untuk menguji berbagai bahan pengencer dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa semen cair sapi Frisien Holstein (FH). Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan satu minggu dua kali. Semen dievaluasi secara makro dan mikroskopis. Semen dengan motilitas >70%, dibagi kedalam 3 tabung dan diencerkan dengan pengencer Tris Kuning Telur (TKT), Sitrat Kuning Telur (SKT) dan Laktosa Kuning Telur (LKT) dengan konsentrasi 10×10^6 mL. Semen cair selanjutnya disimpan pada suhu 5°C. Penurunan motilitas diamati setiap 12 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa tertinggi terdapat pada pengencer TKT ($37,5\% \pm 17,08\%$) diikuti oleh SKT ($30\% \pm 8,16\%$), dan paling rendah LKT ($7,5\% \pm 8,66\%$). Kesimpulan penelitian ini adalah pengencer TKT merupakan pengencer terbaik pada semen cair sapi FH.

Keywords : daya tahan spermatozoa, pengencer semen, sapi FH

PENDAHULUAN

Kebutuhan konsumsi daging dan susu dari tahun ke tahun mengalami peningkatan. Hal ini dapat dijadikan indikator prospek industri peternakan yang menjanjikan dimasa yang akan datang. Tingkat populasi sapi dari tahun ke tahun tidak beranjak dari angka 11 juta ekor, angka ini tidak dapat mendukung pemenuhan kebutuhan konsumsi daging nasional. Akibatnya sampai saat ini Indonesia masih mengimpor daging sapi dengan jumlah 350.000 ekor setiap tahunnya. Ketersediaan susu dari dalam negeri juga masih rendah sehingga untuk mencukupi kebutuhan masyarakat pemerintah masih mengimpor lebih dari 70% (Trobos, 2008).

Untuk meningkatkan populasi dan mutu genetik ternak perlu diupayakan suatu teknologi reproduksi. Berbagai teknologi reproduksi seperti inseminasi buatan (IB), *in vitro* fertilisasi, transfer embrio, sampai dengan teknik *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI) telah berkembang pesat (Foote, 2000) tetapi untuk kondisi Indonesia, IB adalah satu-satunya teknologi reproduksi yang paling aplikatif dan telah memasyarakat secara luas terutama pada ternak sapi perah.

Teknik IB adalah pemasukan atau penyampaian semen ke dalam saluran reproduksi betina dengan menggunakan alat-alat buatan manusia bukan secara alam. Teknik IB dirasakan banyak memberikan manfaat bagi perkembangan dunia peternakan, diantaranya adalah dapat mengoptimalkan penggunaan pejantan-pejantan unggul (Campbell *et al.*, 2003), memperpendek *calving interval*, mengatasi kendala jarak dan waktu, mencegah penularan penyakit menular, dan menghemat biaya pemeliharaan pejantan.

Keberhasilan IB ditentukan oleh berbagai faktor, diantaranya adalah faktor ternak betina, faktor inseminator, faktor peternak dan faktor pejantan, dalam hal ini adalah kualitas semen yang dideposisikan ke dalam organ reproduksi betina. Semen yang digunakan untuk IB, dapat menggunakan semen segar, semen cair ataupun semen beku.

Semen cair adalah semen segar yang telah diberi bahan pengencer dan disimpan pada suhu 5°C dan dapat digunakan dalam 3 sampai dengan 4 hari. Prinsip utama pengawetan semen cair adalah menekan metabolisme spermatozoa. Menurut Mc. Kinnon (1999), setiap penurunan suhu 10°C akan menurunkan metabolisme spermatozoa sampai 50%. Dengan menghambat metabolisme spermatozoa, maka akan dapat mempertahankan viabilitasnya beberapa hari sampai saat digunakan untuk IB. Selama penyimpanan spermatozoa harus ditambahkan media berupa bahan pengencer yang harus mengandung sumber energi, buffer/larutan penyangga, komponen isotonis dan pelindung terhadap kejutan dingin (*cold shock*) yang terjadi selama penyimpanan pada suhu rendah.

Berbagai bahan pengencer telah diteliti oleh para ahli, diantaranya susu segar, susu skim, tris kuning telur dan sitrat kuning telur (Vishwanath dan Shannon, 2000) serta laktosa kuning telur. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji kemampuan berbagai bahan pengencer dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa sapi FH.

MATERIAL DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium inseminasi buatan, Unit Rehabilitasi dan Reproduksi (URR), Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Pada bulan September sampai dengan Desember 2008.

Materi Penelitian

Sebagai sumber semen digunakan sapi Frisien-Holstein (FH), yang telah dewasa kelamin berumur 5 tahun dipelihara secara individual, diberi pakan konsentrat 1% dan hijauan 10% berat badan dengan pemberian air minum secara *ad libitum*.

Metode penelitian

Penyiapan Bahan Pengencer

Pengencer semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tris KuningTelur (TKT), Sitrat Kuning Telur (SKT), Laktosa Kuning Telur (LKT).

a. Pembuatan buffer

Bahan	TKT	SKT	LKT
Tris (hydroxy methyl) amino methan (g)	3.028	-	
Fruktosa (g)	1.7	-	
Asam sitrat(g)	1.25	-	
Natrium sitrat (g)		2,9	
Laktosa (g)			11
Aquades <i>ad</i> (ml)	100	100	100

Seluruh bahan kimia berasal dari Merck,KgaA, Darmstadt Germany

b. Pembuatan Pengencer Semen

Bahan	TKT	SKT	LKT
Buffer Tris (ml)	80	-	-
Buffer Sitrat (ml)	-	80	-
Buffer laktosa (ml)	-	-	80
Kuning telur (ml)	20	20	20

TKT (Tris KuningTelur); SKT (Sitrat Kuning Telur), LKT (Laktosa KuningTelur).

Untuk menghambat pertumbuhan kuman, pada bahan pengencer ditambahkan antibiotik penisilin 1000 IU dan streptomisin 1 mg per mL bahan pengencer.

Koleksi semen

Koleksi semen dilakukan pada pagi hari menggunakan vagina buatan dengan sapi betina sebagai pemancing. Koleksi dilakukan sebanyak 1 kali ejakulat satu minggu dua kali.

Evaluasi Semen

Evaluasi semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume dan konsistensi, warna, dan derajat keasaman (pH) dari semen tersebut. Sedangkan evaluasi mikroskopis meliputi gerakan massa spermatozoa yang dengan nilai gerakan sangat baik (+3), gerakan baik (+2), gerakan kurang baik (+1), dan tidak ada gerakan massa (0). Motilitas spermatozoa dihitung secara subyektif kuantitatif dari 5 lapang pandang berdasarkan jumlah perbandingan spermatozoa yang motil dengan yang tidak motil. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan Neubauer chamber dari 5 kotak hitung. Persentase spermatozoa hidup dan spermatozoa mati serta morfologi spermatozoa

dihitung menggunakan pewarnaan eosin nigrosin dari 10 lapang. Spermatozoa hidup dicirikan dengan kepala spermatozoa tidak menyerap warna sedangkan spermatozoa mati menyerap warna merah ungu.

Pengolahan Semen

Hanya semen yang mempunyai motilitas spermatozoa > 70% digunakan untuk pengolahan lebih lanjut. Semen dibagi ke dalam 3 tabung dan diencerkan dengan pengencer TKT, SKT dan LKT dengan dosis inseminasi 10^6 /ml. Semen yang telah diencerkan disimpan pada lemari es suhu 5°C dengan teknik *water jacket*. Untuk mengetahui daya tahan hidup spermatozoa, semen cair dievaluasi motilitasnya setiap 12 jam.

Analisis Data

Peubah yang diamati adalah motilitas spermatozoa dengan perbedaan jenis bahan pengencer yang dipakai. Data penurunan motilitas setiap 12 jam selama 48 jam pengamatan, ditabulasi diuji secara deskriptif, dicari rata-rata dan simpangan bakunya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar Sapi

Pemeriksaan kualitas semen segar sapi dilakukan untuk mengetahui kelayakan semen segar tersebut untuk diproses lebih lanjut. Hasil pemeriksaan makroskopis menunjukkan volume semen sebanyak $5,63 \pm 1,73$ ml, berwarna krem keputihan, konsistensi sedang, dengan derajat keasaman (pH) $6,40 \pm 0,00$. Secara mikroskopis gerakan massa mempunyai nilai $2,50 \pm 0,58$ dengan persentase spermatozoa yang motil progresif sebesar $72,50 \pm 2,89\%$. Konsentrasi spermatozoa sebanyak $715 \pm 88,88 \times 10^6$ /mL. Nilai spermatozoa hidup adalah $77,60 \pm 1,10\%$ dengan spermatozoa yang normal sebesar $89,93 \pm 6,30\%$ dengan konsentrasi spermatozoa $715 \pm 88,88$ juta/ml (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil evaluasi semen segar sapi *Frisien Holstein*

Parameter	Ulangan ke-				Rataan
	1	2	3	4	
Makroskopis					
Volume	6	6	7,5	3	$5,63 \pm 1,73$
Konsistensi	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang	Sedang
pH	6,4	6,4	6,4	6,4	$6,40 \pm 0,00$
Warna	Krem	Krem	Putih susu	Krem	Krem keputihan
Mikroskopis					
Gerakan massa (+)	3	3	2	2	$2,50 \pm 0,58$
Spermatozoa motil (%)	70	70	75	75	$72,50 \pm 2,89$

Konsentrasi (10^6)	630	840	700	690	$715 \pm 88,88$
Spermatozoa hidup (%)	78,50	80,00	63,20	88,70	$77,60 \pm 10,60$
Spermatozoa normal (%)	92,50	81,00	90,60	95,60	$89,93 \pm 6,30$

Berdasarkan Tabel 1, hasil pengujian semen segar secara makroskopis maupun mikroskopis masih dalam kisaran semen sapi yang normal menurut Garner dan Hafez (2000), sehingga dapat digunakan untuk pengolahan semen lebih lanjut.

Motilitas Spermatozoa Berbagai Bahan Pengencer

Penambahan bahan pengencer ke dalam semen bertujuan untuk memperbanyak volume semen sehingga jumlah betina yang dapat difertilisasi secara buatan menjadi lebih banyak (Campbell *et al.*, 2003). Selain menambah volume, bahan pengencer harus dapat mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa dalam jangka waktu tertentu.

Pada penelitian ini, digunakan tiga macam pengencer yaitu tris kuning telur (TKT), sitrat kuning telur (SKT), dan laktosa kuning telur (LKT). Ketiga pengencer ini sudah dikenal luas dan telah banyak digunakan dalam berbagai aplikasi pengenceran semen. Paulenz *et al.* (2002) mengungkapkan bahwa masing-masing pengencer memiliki keistimewaan dan mampu memberikan pengaruh yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa. Campbell *et al.* (2003) menyatakan bahwa bahan pengencer harus memiliki nutrisi yang cukup, pH sekitar 6,5 – 6,7, mengandung buffer dan mampu memberikan proteksi terhadap kontaminasi bakteri dan *cold shock*. Bahan pengencer juga harus bebas dari bahan-bahan toksik, mudah dibuat, dapat diproduksi kembali, murah dan mudah diperoleh.

Pengamatan motilitas spermatozoa sapi FH dengan berbagai macam bahan pengencer didapatkan hasil yang berbeda untuk setiap bahan pengencer yang digunakan. Pada Tabel 2 terlihat bahwa sampai dengan penyimpanan jam ke-48, motilitas spermatozoa tertinggi terdapat pada pengenceran TKT ($37,5\% \pm 17,08\%$), diikuti oleh SKT ($30\% \pm 8,16\%$), dan motilitas spermatozoa terendah terdapat pada pengencer LKT ($7,5\% \pm 8,66\%$).

Perbedaan hasil motilitas semen pada tiap-tiap pengencer dipengaruhi oleh perbedaan komposisi yang terkandung dalam bahan pengencer. Pada Tabel 2 pengencer tris kuning telur mempunyai komposisi yang paling lengkap, didalamnya terkandung buffer tris yang dilaporkan sebagai buffer universal yang cocok hampir untuk semua jenis semen. Kandungan buffer tersebut mampu menjaga keseimbangan pH pengencer. Kandungan fruktosa dalam pengencer Tris juga memberikan pengaruh yang baik pada motilitas spermatozoa. Fruktosa merupakan karbohidrat monosakarida yang berfungsi sebagai sumber nutrisi untuk menghasilkan energi bagi spermatozoa sehingga motilitas spermatozoa dapat dipertahankan (Paulenz *et al.*, 2002). Fruktosa juga dinyatakan lebih mudah dimetabolisme oleh spermatozoa dan umum diberikan pada pengencer semen cair maupun semen beku pada berbagai ternak (Vishwanath dan Shannon, 2000, Eiman *et al.*, 2004). Kuning telur merupakan sumber lesitin dan phospholipid,

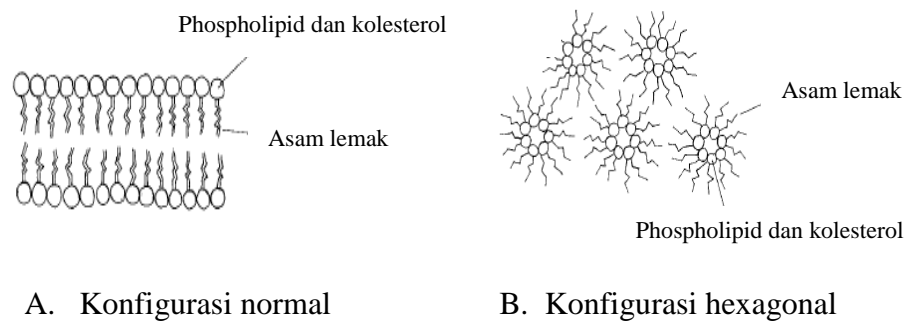
yang bekerja melindungi membran sel dari cekaman dingin. Pengenceran dengan sitrat didapatkan motilitas yang lebih kecil dibandingkan dengan pengencer tris. Sitrat mempunyai kemampuan sebagai larutan penyangga namun sitrat tidak mengandung fruktosa seperti pada TKT. Pada pengencer LKT, terlihat bahwa pengencer ini kurang cocok untuk pengencer sapi, hal ini kemungkinan diakibatkan oleh tidak adanya unsur buffer di dalam pengencer tersebut.

Tabel 2 Motilitas spermatozoa (%) sapi FH pada berbagai bahan pengencer

Bahan Pengencer	Ulangan ke	Jam pengamatan				
		0	12	24	36	48
SKT	1	65	55	53	40	30
	2	60	55	50	15	10
	3	70	65	60	30	20
	4	70	60	40	35	20
	Rataan	66,25±4,78	58,75±4,78	50,75±8,30	50,75±10,81	30±8,16
TKT	1	60	55	50	50	45
	2	65	65	65	60	55
	3	75	70	60	50	35
	4	65	55	45	35	15
	Rataan	66,25± 6,29	61,25±7,50	55,0±9,13	48,75±10,1	37,50±17,08
LKT	1	55	50	40	30	20
	2	55	35	15	10	5
	3	30	25	10	5	5
	4	60	35	15	5	0
	Rataan	50,00±13.54	36.25±10.31	20,00±13.54	12.50±11.90	7.50±8.66

Tanpa melihat jenis pengencer yang digunakan, secara umum kualitas semen cair, menurun sejalan dengan waktu penyimpanan. Hal ini disebabkan oleh proses metabolisme yang terjadi selama penyimpanan. Meskipun metabolisme dihambat pada penyimpanan suhu rendah, tetapi metabolisme masih tetap terjadi. Menurut Best (2006), dalam proses metabolisme spermatozoa akan dihasilkan hasil akhir radikal bebas berupa derivat oksigen diantaranya adalah *singlet oxygen* (1O_2), *triplet oxygen* (3O_2) *superoxide anion* ($.O_2^-$), *hydroxyl radical* ($.OH$) dan *nitric oxide* ($.NO^-$) yang keseluruhannya disebut dengan *reactive oxygen species* (ROS). *Singlet oxygen* dapat merusak ikatan rangkap pada asam lemak sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada DNA dan protein. *Singlet oxygen* jika bereaksi dengan asam amino histidin akan membentuk enzim yang dapat menyebabkan denaturasi protein.

Kerusakan spermatozoa saat preservasi pada suhu 5 °C, selain akibat ROS juga akibat terjadinya *cold shock*. Dengan menurunkan suhu penyimpanan sampai 4-5 °C, metabolisme akan dihambat dan dapat mempertahankan hidup spermatozoa lebih lama dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu ruangan. Akan tetapi suhu yang rendah tersebut akan menyebabkan terjadinya kejutan dingin pada spermatozoa yang dikenal dengan *cold shock*.



Gambar 1. Perubahan membran spermatozoa sebelum (A) dan sesudah *cold shock* (B) (Sumber Amann dan Graham 1993 di dalam Morel 1999).

Pada penelitian ini selain perbedaan kandungan bahan pengencer, kerusakan akibat ROS dan juga cold shock, menyebabkan semen cair sapi FH hanya bisa bertahan sampai jam ke 48.

KESIMPULAN

Pada pembuatan semen cair sapi FH, pengencer TKT merupakan pengencer terbaik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa sampai 48 jam pengamatan.

DAFTAR PUSTAKA

- [Anonim]. 2008. *Pembibitan, Harus!*. Di dalam majalah Trobos No. 105 Juni 2008 Tahun VIII. Jakarta: Permata Wacana Lestari.
- Best, B. 2006. Aging Mechanism. http://www.benbest.com/cryonics/aging_mechanism.html. [4 September 2006]
- Campbell, J.R., M.D. Kenealy, K.L. Campbell. 2003. *Animal Science*. 4th Ed. New York: Mc Graw-Hill.
- Eiman, M., E. Aboagla, T. Terada. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160-1172.
- Foote, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim Sci* 80:1-10.
- Garner, D.L., E.S.E. Hafez. 2000. *Spermatozoa and seminal plasma*. Di dalam Hafez B, E.S.E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. 7th Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- McKinnon, A.O. 1999. Breeding and Its technology - now and the future. www.harness.org.au/99wldcon/CONFEREN.HTM [4 Juli 2006].

- Morel, D.M.C.G. 1999. *Equine Artificial Insemination*. Wallingford : CABI Publishing.
- Paulenz H, L. Soderquist, R. Perez-Pe, K.A. Berg. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.
- Vishwanath R, P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62: 23-53.