ISSN 0853-7380

Terakreditasi dengan nilai B
No. 56/DIKTI/Kep/2005
Terakreditasi dengan nilai A
No. 53/AKRED-LIPI/P2MBI/12/2006

Jurnal

ILMU TERNAK DAN VETERINER

Volume 12
Nomor 2
2007

Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan
Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Departemen Pertanian

Kriopreservasi Semen Kuda Menggunakan Berbagai Krioprotektan pada Pengencer Susu Skim

R.I. ARIFIANTINI dan I. SUPRIATNA

Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB, Darmaga 16680, Bogor

(Diterima dewan redaksi 16 April 2007)

ABSTRACT

ARIFIANTINI, R.I. and I. SUPRIATNA. 2007. Stallion semen cryopreservation using different cryoprotective agents on the skim milk trehalosa extender. *JITV* 12(2): 139-146.

Cryoprotective agents (CPAs), protect the sperm during cryopreservation. There are two general classes of CPAs, at first penetrating cryoprotectants, these pass through the sperm membrane and act both intracellular and extracellularly, and the second non-penetrating cryoprotectants, these act only extracellularly. The objective of this study was to evaluate the addition of different CPAs namely glycerol (G), combination of ethylene glycol with glycerol (EG) and dimethilformamide (DMF) using skim milk trehalosa extender. The semen collected from 3 stallions using artificial vagina twice aweeks. The semen was evaluated, centrifugated and diluted in skim milk extender supplemented with 50 mM trehalose and three different CPAs with the concentration of sperm were 200×10^6 ml^{-1}. Extended semen was then packed into minitub 0.3 ml and equilibrated at 4°C for 2 hours, freeze in the liquid nitrogen vapor for 10 minutes and stored in liquid nitrogen container -196°C. After 24 hours, the semen was thawed at 37°C for 30 second. Results of this experiment indicated that the percentage of motile and viable sperm in skim trehalosa extender using DMF and glycerol better than combination of ethylene glycol and glycerol.

Key Words: Cryopreservation, Stallion Sperm, Cryoprotectant

ABSTRAK

ARIFIANTINI, R.I. dan I. SUPRIATNA. **2007.** Kriopreservasi semen kuda menggunakan berbagai krioprotektan pada pengencer susu skim trehalosa. *JITV* 12(2): 139-146.

Krioprotektan akan melindungi spermatozoa pada saat kriopreservasi. Secara umum ada dua kelompok yaitu krioprotektan intraseluler yang bisa masuk/penetrasi ke dalam sel, dapat bekerja di dalam dan di luar sel. Kelompok kedua adalah krioprotektan ekstraseluler yang bekerja hanya di luar sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji peranan berbagai krioprotektan yaitu DMF, gliserol dan kombinasi gliserol dan etilen glikol pada pembekuan semen kuda pada pengencer skim trehalosa. Semen yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tiga ekor kuda jantan milik Athena *stable*, Cinere-Depok. Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dua kali seminggu. Semen dievaluasi secara makro- dan mikroskopis. Selanjutnya disentrifugasi, dibuang supernatannya dan pellet (spermatozoa) diencerkan dengan pengencer susu skim yang disuplementasi dengan 50 mM trehalosa, dengan tiga jenis krioprotektan dengan konsentrasi spermatozoa 200×10^6 ml^{-1} Semen yang telah diencerkan dikemas menggunakan minitub 0,3 ml, diekuilibrasi pada suhu 4°C selama dua jam dan dibekukan pada uap nitrogen cair selama 10 menit. Semen beku kemudian disimpan pada kontainer nitrogen cair dengan suhu -196°C. Setelah 24 jam, semen di*thawing* dengan suhu 37°C selama 30 detik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa semen beku menggunakan krioproptektan DMF dan.gliserol pada pengencer skim trehalosa lebih baik dibandingkan dengan kombinasi gliserol dengan etilen glikol.

Kata Kunci: Pembekuan Semen Kuda, Krioprotektan

PENDAHULUAN

Semen kuda terdiri atas tiga fraksi yaitu fraksi pra-spermatozoa, fraksi kaya-spermatozoa dan fraksi pasca-spermatozoa yang diejakulasikan sebanyak tujuh sampai sembilan *jets* (semprotan), dengan volume yang banyak dan konsentrasi spermatozoa yang rendah. Semen kuda memiliki kandungan sodium yang relatif lebih tinggi dari jenis semen lainnya. Kadar sodium klorida yang tinggi di dalam semen kuda akan memberikan pengaruh negatif pada saat pendinginan atau pembekuan (MOTTERSHEAD, 1999; 2000). Disamping itu kemampuan spermatozoa bertahan terhadap proses pembekuan *(freezing capability)* sangat rendah, yaitu hanya 24% (LINFOR *et al.*, 2002) sampai 33% (VIDAMENT *et al.*, 2002) atau 30-40% (ALVARENGA *et al.*, 2004). Oleh karena itu berbagai aspek seperti pengencer dan krioprotektan yang digunakan harus diperhatikan dalam proses pengolahan semen beku pada kuda.

Pembekuan akan merangsang dehidrasi, dan menyebabkan transisi dari phase *thermotropic* dan *lyotropic* dari membran *phospholipid*, peningkatan konsentrasi larutan dan pembentukkan kristal es intra dan ekstra seluler (PARK dan GRAHAM, 1992). Proses pendinginan, pembekuan dan *thawing* akan menyebabkan perubahan suhu yang drastis sehingga menimbulkan kerusakan pada membran sel spermatozoa. Selain itu spermatozoa akan mengalami perubahan tekanan osmotik saat dipaparkan pada bahan pengencer yang mengandung krioprotektan. Karbohidrat dapat berfungsi ganda dimana karbohidrat sederhana seperti glukosa dan fruktosa dibutuhkan sebagai sumber energi, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Penggunaan disakarida (trehalosa), trisakarida (*raffinosa*) dan oligosakarida pada pengenceran semen beberapa ternak diduga lebih mampu melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan (YILDIZ *et al.*, 2000). Trehalosa dan raffinosa adalah karbohidrat dengan molekul besar yang berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (RUDOLPH dan CROWE, 1985). Penggunaan trehalosa dan EDTA pada pembuatan semen beku domba dilaporkan dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa dibandingkan dengan hanya menggunakan fruktosa (AISEN *et al.*, 2000).

Krioprotektan ideal untuk pembekuan spermatozoa harus memiliki bobot molekul yang kecil, mudah larut dalam air dan memiliki toksisitas yang rendah (ALVARENGA *et al.*, 2005). Berdasarkan bahan yang dikandung didalamnya krioprotektan digolongkan pada dua kelompok yaitu kelompok alkohol (etilen glikol dan alkohol) dan amida (methilformamide dan dimethilformamide). Gliserol dapat masuk ke dalam spermatozoa sapi dalam waktu 3 sampai 4 menit (BERNDTSON dan FOOTE, 1972) sedangkan etilen glikol dapat masuk ke dalam sel 1½ kali lebih cepat dari gliserol. Penggunaan amida sebagai krioprotektan pada pembekuan semen kuda dilaporkan pertama kali tahun 2000-an oleh Alvarenga dan teman-temannya (ALVARENGA *et al.*, 2004). Mekanisme bagaimana methilformamide (MF) dan dimethilformamide (DMF) melindungi spermatozoa kuda belum banyak dilaporkan.

Penelitian pengaruh krioprotektan pada sperma beku kuda telah banyak dilakukan. HENRY *et al.* (2002) menggunakan gliserol, etilen glikol, dikombinasikan dengan karbohidrat methil sellulosa, trehalosa dan acetamid dan ternyata kualitas semen yang terbaik adalah kombinasi gliserol dan etilen glikol. Dimethil formamide (DMF) 2%, merupakan krioprotektan yang lebih baik dibandingkan gliserol atau kombinasi DMF dan gliserol (VIDAMEN *et al.*, 2002). Dimethil formamide 5% juga mempunyai kemampuan melindungi sel terhadap pembekuan lebih baik dibandingkan dimethil acetamid, methil formamid atau gliserol dengan konsentrasi yang sama (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan menguji penggunaan berbagai krioprotektan dalam pengencer skim trehalosa pada pembekuan semen kuda yang dievaluasi secara subjektif kuantitatif dan menggunakan *computerized assisted sperm analyzed* (CASA).

MATERI DAN METODE

Tiga ekor kuda jantan yang digunakan sebagai sumber semen dalam penelitian ini milik Athena *stable.* Cinere-Depok, terdiri dari satu ekor generasi empat (G4) Thoroughbred (Jantan 1), satu ekor American pinto (Jantan 2) dan satu ekor Swedis *warmblood* (Jantan 3) . Kuda-kuda tersebut berumur antara 5 dan 8 tahun merupakan hasil seleksi dengan kriteria sehat dan teruji menunjukkan kualitas terbaik dari evaluasi produksi spermatozoa harian. Kuda-kuda tersebut dikandangkan secara individual diberi pakan berupa konsentrat dan *brand* masing-masing sebanyak 3 kg serta rumput yang telah dilayukan sebanyak 10 kg. Air minum diberikan *ad libitum.*

Bahan pengencer yang disiapkan adalah, pengencer dasar sentrifugasi terdiri atas skim glukosa (KENNEY *et al.*, 1975) yang terdiri atas skim 2,4 g (Tropicana slim, plain) dan glukosa 4 g (Merck,KgaA, Darmstadt Germany) dalam milli-Q *water ad* 100 ml. Campuran dipanaskan pada suhu 92-95°C selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Diberi antibiotik streptomisin 100 mg (Meiji, Japan) dan penisilin 100 000 IU (Meiji, Japan). Pengencer semen beku adalah pengencer dasar sentrifugasi disuplementasi dengan trehalosa 50 mM (Sigma, Chemical Co. St. Louis, Mo, USA). Sebagai krioprotektan digunakan gliserol 5% (G), kombinasi etilen glikol 3% dengan gliserol 3% (EG) dan dimethilformamid 5% (DMF) (Merck, KgaA, Darmstadt Germany) (Tabel 1).

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan tipe Nishikawa (Jepang) dan dimodifikasi dengan tabung penampung semen tipe Missouri (Nasco, Fort Atkinson, WI) . Pada mulut botol penampung dipasang kain kassa untuk menyaring bagian gel (ARIFIANTINI *et al.*, 2006). Semen yang diperoleh masing-masing dievaluasi secara makroskopis terhadap volume (ml), warna, konsistensi dan pH diukur menggunakan *pH special indicator paper* (Merck, interval 6,4-10 skala 0,2), Secara mikroskopis evaluasi dilakukan dengan menghitung persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa per ml dihitung menggunakan *Neubauer chamber* dengan pengenceran 100 X dalam NaCl 3% (PARISH'S, 2003) dan morfologi (normalitas) dengan pewarnaan Williams (ANONIM, 2004).

Tabel 1. Bahan

Skim
Glukosa (g)
Mili-Q *water*
Trehalosa (ml
Streptomisin
Penicilin (IU)
Gliserol (ml)
Etilen glikol
DMF (ml)
Tekanan osm

Untuk ke
masing-masi
dan ditamba
disentrifugas
(Hettich, E
kecepatan 1
sentrifugasi,
(spermatozoa
(STDMF) s
trehalosa et
konsentrasi
selanjutnya
Tiefenbach,
diekuilibrasi
Pembekuan
cm dari per
beku disimp
jam. *Thawin*
30 detik.

Pengama
motilitas da
setelah pen
thawing,
pembanding
thawing
Tiefenbach,
(BIB) Unga

Keberha
rate (RR),
pulih dari
rumus:

RR =

Tabel 1. Bahan pengencer semen beku

	Jenis pengencer		
	STG	STEG	STDMF
Skim	2,4	2,4	2,4
Glukosa (g)	4	4	4
Mili-Q *water* (ml)	100	100	100
Trehalosa (mM)	50	50	50
Streptomisin (mg)	100	100	100
Penicilin (IU)	100,000	100,000	100,000
Gliserol (ml)	5	3	
Etilen glikol (ml)		3	
DMF (ml)			5
Tekanan osmotik (mosm/kg)	1089	1317	1234

Untuk kepentingan pengenceran, semen segar dari masing-masing pejantan dibagi ke dalam tiga tabung dan ditambah bahan pengencer skim 1 : 1. Selanjutnya disentrifugasi menggunakan sentrifuse *portable* (Hettich, EBA 3S, Tuttlingen. Jerman) dengan kecepatan 1006 x *g* selama 15 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang dan *pellet* (spermatozoa) dengan pengencer skim trehalosa DMF (STDMF) skim trehalosa gliserol (STG) dan skim trehalosa etilen glikol dan gliserol (STEG) dengan konsentrasi spermatozoa $200x10^6$ ml^{-1}. Semen selanjutnya dikemas ke dalam straw 0,3 ml (Minitüb, Tiefenbach, Germany) disusun di dalam kaset dan diekuilibrasi pada suhu 4-5°C selama dua jam. Pembekuan dilakukan dalam uap N_2 cair dengan jarak 4 cm dari permukaan N_2 cair selama 10 menit. Semen beku disimpan di dalam kontainer N_2 cair, selama 24 jam. *Thawing* dilakukan pada air hangat (37°C) selama 30 detik.

Pengamatan semen dilakukan terhadap persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada semen segar, setelah pengenceran, setelah ekuilibrasi dan setelah *thawing*, secara subjektif kuantitatif. Sebagai pembanding dilakukan pengujian kualitas setelah *thawing* menggunakan spermVision (Minitüb, Tiefenbach, Germany) di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran, Jawa Tengah.

Keberhasilan pembekuan juga dinilai dari *recovery rate* (RR), yaitu jumlah spermatozoa yang berhasil pulih dari proses pembekuan yang dihitung dengan rumus:

$$RR = \frac{PSMTS}{PSMSS} \times 100\%$$

Keterangan:
RR = *Recovery rate*
PSMTS = Persentase spermatozoa motil setelah thawing
PSMSS = Persentase spermatozoa motil semen segar

Sumber: HAFEZ, 1993)

Data dianalisis menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan percobaan diulang sebanyak empat kali. Jika ada perbedaan dalam perlakuan dilanjutkan dengan Uji Duncan (WALPOLE, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Kualitas semen segar menunjukkan hasil yang cukup baik dengan volume semen tanpa gel adalah 27,7±10,1 ml, pH 7,0±0,1, berwarna putih keruh dan konsistensi yang encer (Tabel 2). Volume semen kuda dalam kisaran normal menurut MEREDITH (1995) 15-100 ml dan MOREL (1999) 30-300 ml. Secara mikroskopis motilitas dan viabilitas spermatozoa adalah 72,5±2,9% dan 84,4±5,2%. Angka ini berada dalam kisaran motilitas yang normal yaitu berkisar 40-70% (MEREDITH, 1995) atau 70-95% (KACKER dan PAMVAR, 1996).

Konsentrasi spermatozoa yang didapat adalah $222,7±18,1x10^6$ ml^{-1} dan angka ini juga berada dalam kisaran konsentrasi spermatozoa kuda yang normal yaitu $30\text{-}600x10^6 ml^{-1}$ (MOREL, 1999). Persentase spermatozoa dengan morfologi normal sebesar 74,2±3,3%. Angka tersebut berada dalam kisaran normal menurut COLENBRANDER *et al.*, (1992) yaitu sebesar 54-70%. Persentase spermatozoa normal dari semen kuda lebih rendah jika dibandingkan dengan ternak lainnya (GARNER dan HAFEZ, 2000; COLENBRANDER *et al.*, 1992). Pada ternak kambing dan domba persentase spermatozoa normal umumnya

Tabel 2. Kualitas semen segar kuda

Makroskopis	Jantan 1	Jantan 2	Jantan 3	Rataan
Volume (mL)	26,8 ± 7,9	22,5 ± 2,8	36,25 ± 13,1	27,7 ± 10,1
pH	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1	6,95 ± 0,2	7,0 ± 0,1
Konsistensi	encer	encer	encer	encer
Warna	Putih keruh	Putih keruh	Putih keruh	Putih keruh
Mikroskopis				
Motilitas (%)	63,8 ± 2,5	76,3 ± 2,5	77,5 ± 2,8	72,5 ± 2,9
Viabilitas (%)	79,8 ± 2,4	87,4 ± 1,7	86,8 ± 0,8	84,4 ± 5,2
Normalitas (%)	71,8 ± 4,0	75,3 ± 2,7	76,1 ± 1,6	74,2 ± 3,3
Konsentrasi (10^6 ml^{-1})	207 ± 14,8	227,3 ± 18,4	234,5 ± 9,8	222,7 ± 18,1

berkisar antara 80 dan 85% (GARNER dan HAFEZ, 2000). Kualitas semen kuda dipengaruhi oleh bangsa dan umur (DOWSETT dan KNOTT, 1996). Ketiga pejantan yang digunakan berada dalam kisaran umur yang sama yaitu antara 5 dan 8 tahun yang merupakan umur ideal untuk digunakan, meskipun berasal dari bangsa kuda yang berbeda. Besarnya standar deviasi volume semen dan konsentrasi spermatozoa yang dikoleksi menunjukkan kuatnya pengaruh bangsa kuda.

Pengaruh berbagai Krioprotektan terhadap kualitas semen beku pada pengencer skim Trehalosa

Kualitas semen beku setelah *thawing* terbaik yang dinilai secara subjektif kuantitatif adalah STDMF dengan motilitas spermatozoa sebesar 28,5 ± 5,6% diikuti oleh STG dengan motilitas spermatozoa 23,7±6,4% dan yang paling rendah adalah skim STEG dengan motilitas spermatozoa hanya 12,8 ± 5,0% (Tabel 3).

Keunggulan STDMF dibandingkan dengan pengencer yang lain juga terlihat dari viabilitas spermatozoa setelah thawing, dengan nilai 48,0 ± 10,3% dibandingkan dengan STG 45,2 ± 8,5% dan STEG yang hanya 37,1 ± 8,3% (Tabel 4).

Evaluasi menggunakan CASA memperkuat hasil tersebut. Pengencer STDMF menunjukkan motilitas total sebesar 71,6 ± 11,6% dan progresif motil sebesar 35,1 ± 14,8% lebih tinggi dibandingkan dengan STG dan STEG (Tabel 5). Spermatozoa dengan motilitas total dan motilitas yang progresif terendah terdapat pada pengencer STEG dengan nilai masing-masing 42,0±13,4% dan 11,9 ± 4,3%.

Evaluasi menggunakan CASA selain dapat mengetahui persentase total motilitas dan motil progresif juga memberikan informasi karakteristik motilitas yang lengkap seperti *dance average path velocity* (DAP); *dance curvilinear velocity* (DCL); *dance straight line velocity* (DSL); *average path velocity* (VAP); *curvilinear velocity* (VCL); *straight line velocity* (VSL); *straightness* (STR); *linearity* (LIN); *wobble* (WOB); *amplitude lateral head displacement* (ALH) dan *beat cross frequency* (BCF). Dari 13 karakteristik motilitas spermatozoa tersebut yang paling sering dilaporkan adalah total motil, progresif motil dan VCL.

Informasi mengenai karakteristik motilitas spermatozoa menggunakan spermVision pada pembekuan spermatozoa kuda masih sedikit. Hal ini dikarenakan spermVision merupakan CASA terbaru dan belum banyak digunakan. Beberapa evaluasi menggunakan CASA yang dapat dibandingkan dengan hasil penelitian ini adalah nilai persentase spermatozoa yang mengalami hiperaktif akibat pembekuan spermatozoa. Spermatozoa yang hiperaktif mempunyai nilai WOB < 56% dan VCL > 169 µm/s, sedangkan pada penelitian ini menunjukkan nilai WOB 63,3 (58 - 66) % dan VCL 63,3 (59,9 - 68,9) µm/s. Hasil tersebut mengindikasikan tidak terlalu banyak spermatozoa yang mengalami hiperaktif. Gerakan spermatozoa yang hiperaktif biasanya berhubungan dengan kapasitasi spermatozoa. Spermatozoa yang mempunyai gerakan yang cepat (*rapid average path* = RAP) adalah yang mempunyai nilai VCL >30 µm/s. Nilai rataan VCL hasil penelitian ini adalah 63,3 µm/s, sehingga dapat digolongkan spermatozoa bergerak dengan cepat. Untuk bisa menembus lendir serviks spermatozoa harus mempunyai nilai VAP > 25 µm/s dan ALH > 4,5 µm/s, sedangkan pada penelitian ini nilai VAP adalah 39,5 (37,9 – 40,4) µm/s dengan nilai ALH 4,2 (3,9 – 4,7) µm/s. Nilai ALH terendah terdapat pada STEG dan STG (3,9 dan 4,0 µm/s) dan tertinggi 4,7 µm/s pada pengencer STDMF. Berdasarkan perbandingan tersebut evaluasi menggunakan CASA dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang cukup baik.

Tabel 3. Pengaru

Parameter
Semen segar
Motilitas sperm
Motilitas sperm
Motilitas sperm
Recovery rate

Huruf berbed
G (gliserol); E

Tabel 4. Pengar

Parameter
Semen segar
Viabiilitas spe
Viabilitas sper
Viabilitas sper

Huruf berbe
G (gliserol);

Tanpa me
penurunan k
ekuilibrasi m
setelah ekuili
tinggi antara
keseluruhan a
44,0% pada
STEG sebesa
Berdasark
dikelompokk
dan di luar s
(BEST, 2006
terkandung
menjadi dua
glikol, glise
(dimetilform
lain) (ALVAR
dalam melin
selain dari

Tabel 3. Pengaruh berbagai krioprotektan terhadap persentase motilitas spermatozoa pada berbagai tahap pembekuan

Parameter	Skim trehalosa		
	G	EG	DMF
Semen segar			
Motilitas spermatozoa (%) setelah ekuilibrasi	72,5±2,9^{a}	72,5±2,9^{a}	72,5±2,9^{a}
Motilitas spermatozoa (%) setelah thawing	56,0±9,1^{b}	52,0±9,2^{b}	57,5±8,9^{b}
Motilitas spermatozoa (%)	23,7±6,4^{c}	12,8±5,0^{d}	28,5±5,6^{c}
Recovery rate (%)	32,7	17,6	39,3

Huruf berbeda yang mengikuti angka pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0.01).
G (gliserol); EG (etilen glikol dan gliserol); DMF (dimethilformamide)

Tabel 4. Pengaruh berbagai krioprotektan terhadap persentase viabilitas spermatozoa pada berbagai tahap pembekuan

Parameter	Skim trehalosa		
	G	EG	DMF
Semen segar			
Viabiilitas spermatozoa (%)setelah ekuilibrasi	84,4±5,2^{a}	84,4±5,2^{a}	84,4±5,2^{a}
Viabilitas spermatozoa (%) setelah thawing	68,5 ±7,0^{b}	65,9±8,6^{b}	68,3±7,2^{b}
Viabilitas spermatozoa (%)	45,2±8,5^{c}	37,1±8,3^{cd}	48,0±10,3^{c}

Huruf berbeda yang mengikuti angka pada kolom dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0.01).
G (gliserol); EG (etilen glikol dan gliserol); DMF (dimethilformamide)

Tanpa melihat individu kuda jantan yang digunakan, penurunan kualitas dari semen segar ke setelah ekuilibrasi masih rendah berkisar antara 15-20%, dari setelah ekuilibrasi ke setelah *thawing* penurunan mulai tinggi antara 29,0 dan 39,2%. Penurunan kualitas secara keseluruhan adalah 48,8% pada pengencer STDMF dan 44,0% pada STG, penurunan tertinggi terjadi pada STEG sebesar 59,7%.

Berdasarkan cara kerjanya krioprotektan dikelompokkan menjadi *penetrating* (bekerja di dalam dan di luar sel) dan *non-penetrating* (hanya di luar sel) (BEST, 2006). Sedangkan berdasarkan bahan yang terkandung di dalamnya krioprotektan dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu kelompok alkohol (etilen glikol, gliserol, dan lain-lain) dan kelompok amida (dimetilformamid, asetamid, metilformamid dan lain-lain) (ALVARENGA *et al.*, 2005). Pengaruh krioprotektan dalam melindungi spermatozoa pada saat kriopreservasi selain dari cara kerjanya, juga dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasinya. Krioprotektan dibutuhkan untuk mencegah pembentukkan kristal es, akan tetapi krioprotektan juga bersifat toksik pada saat ekuilibrasi dan setelah *thawing*. Spermatozoa kuda sangat mudah rusak, sehingga pengencer dan krioprotektan yang tepat mutlak dibutuhkan. Dalam penelitian ini krioprotektan DMF secara deskriptif menunjukkan peranan yang lebih baik dalam melindungi spermatozoa pada saat pembekuan dibandingkan dengan gliserol maupun kombinasi etilen glikol dengan gliserol. Hasil ini berbeda dengan laporan SQUIRES *et al.* (2004) pada konsentrasi 0,5 M penambahan gliserol pada pengencer skim menunjukkan persentase motilitas (61%) lebih tinggi dibandingkan dengan methylformamide (MF) yang hanya 40% dan DMF (38%). Jika konsentrasi MF dan DMF ditingkatkan menjadi 0,6 atau 0,9 M maka persentase motilitas spermatozoa meningkat menjadi 48–54% hampir sama dengan gliserol (52%).

Tabel 5. Karakteristik motilitas spermatozoa setelah *thawing* pada semen beku kuda menggunakan berbagai krioprotektan pada pengencer susu skim trehalosa yang dievaluasi dengan CASA

Parameter	STG	STEG	STDMF
Total motil (%)	65,0±7,5b[ab]	42,0±13,4[c]	71,6±11,6[a]
Progresif (%)	28,5±12,8[b]	11,9±4,3[cd]	35,1±14,8[ab]
DAP (μm)	16,2±4,5	14,8±2,9	16,1±1,5
DCL (μm)	19,9±11,5	23,5±5,5	28,2±3,3
DSL (μm)	11,7±2,1	11,2±2,1	12,0±0,8
VAP (μm/s)	40,4±9,4	37,9±8,3	40,1±3,9
VCL (μm/s)	59,9±14,3	61,0±15,8	68,9±9,3
VSL (μm/s)	29,8±4,4	29,13±6,0	30,3±2,1
STR (%)	72,0±0,1	79,0±0,1	75,0±0,1
LIN (%)	50,0±0,1	52,0±0,1	44,0±0,1
WOB (%)	66,0±0,1	66,0±0,1	58,0±0,0
ALH (μm)	3,9±1,0	4,0±0,8	4,7±0,3
BCF (freq)	17,6±3,4	17,7±6,4	17,4±1,3

Huruf berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P<0.05$)
G: gliserol, EG: Etilen glikol dan gliserol, DMF : dimethilformamide

Hasil penelitian ini menguatkan hasil penelitian yang dilaporkan oleh ALVARENGA *et al.* (2000) yang dikutip oleh ALVARENGA *et al.* (2004); MEDEIROS *et al.* (2002) dan VIDAMENT *et al.* (2002) bahwa DMF merupakan krioprotektan terbaik dalam melindungi spermatozoa kuda dari efek pembekuan. Menurut ALVARENGA *et al.* (2004), keunggulan DMF dari krioprotektan lainnya kemungkinan disebabkan oleh daya kontraseptifnya yang rendah terhadap spermatozoa dibandingkan dengan krioprotektan lainnya. Dasar pemilihan jenis krioprotektan menurut SQUIRES *et al.* (2004) selain mengandung bahan yang bekerja melindungi sel pada saat pembekuan juga harus mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih mudah dan cepat penetrasi ke dalam sel sehingga mengurangi toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi. Bobot molekul (BM) etilen glikol, DMF dan gliserol secara berurutan adalah 62,07; 73 dan 92,10. Setelah dicampur dengan larutan pengencer ternyata STG menunjukkan tekanan osmotik 1089 mosm kg^{-1}, pengencer STEG 1317 mosm kg^{-1}dan STDMF 1234 mosm kg^{-1}. MEYERS *et al.* (2004) menyatakan bahwa rataan volume sel spermatozoa kuda adalah 24,4 μm^3 dengan toleransi osmolaritas pengencer antara 150 dan 900 mosmol kg^{-1}. Berdasarkan hal tersebut pengencer yang menunjukkan tekanan osmotik yang mendekati 900 mosm kg^{-1} adalah pengencer STG. Pada kenyataannya kualitas spermatozoa setelah *thawing* pada pengencer STG menunjukkan nilai motilitas progresif lebih rendah dibandingkan dengan pengencer STDMF yang mempunyai tekanan osmotik yang lebih tinggi. Hal ini berarti tidak hanya tekanan osmotik yang mempengaruhi kualitas semen beku setelah *thawing*, tetapi toksisitas krioprotektan dan kandungan bahan pelindung lain yang terkandung di dalam pengencer juga memegang peranan penting.

Spermatozoa kuda sangat mudah terkena *cold shock*. Rentannya spermatozoa kuda ini disebabkan oleh perbedaan komposisi *phospholipid* yang terdapat pada membran plasma. Pada spermatozoa kuda kandungan asam lemak tak jenuh arakidonat (20:4) sangat tinggi yaitu 18,2% (CHOW *et al.*, 1986) sedangkan pada spermatozoa sapi dan domba hanya 3,5 dan 4,5-5% (WHITE, 1993). Selain itu perbandingan kandungan antara asam dokosapentaenoat (DPA;22:5) dan dokosaheksaenoat (DHA;22:6) pada *phosphatidyl-choline* dan *phosphathidyletholamin* jumlahnya terbalik (GADELLA dan BROUWERS dalam GADELLA *et al.*, 2001). Pada spermatozoa sapi dan domba kandungan DPA sangat sedikit, sedangkan pada kuda 17,2%, sebaliknya kandungan DHA pada spermatozoa sapi dan domba sangat tinggi yaitu 61,3 dan 61,4% (WHITE, 1993) tetapi pada spermatozoa kuda hanya 7,6% (CHOW *et al.*, 1986).

Suhu *freezing point* terjadi bersamaan dengan suhu *melting point* (ANONIM, 2006), *Melting point* pada DHA adalah -44°C sedangkan DPA dan arakidonat mempunyai *melting point* masing-masing -54°C dan -49°C (VANDERJAGT *et al.*, 2003). Tingginya kandungan DPA dan arakidonat pada membran plasma kuda dengan *melting point* yang lebih rendah kemungkinan krioprotektan pada

STDMF
1,6±11,6[a]
5,1±14,8[ab]
16,1±1,5
28,2±3,3
12,0±0,8
40,1±3,9
58,9±9,3
30,3±2,1
75,0±0,1
14,0±0,1
58,0±0,0
4,7±0,3
7,4±1,3

hanya tekanan
semen beku
protektan dan
terkandung di
n penting.
terkena *cold*
ini disebabkan
yang terdapat
natozoa kuda
kidonat (20:4)
et al., 1986)
mba hanya 3,5
perbandingan
at (DPA;22:5)
phosphatidyl-
lahnya terbalik
DELLA *et al.,*
ba kandungan
kuda 17,2%,
tozoa sapi dan
1,4% (WHITE,
hanya 7,6%

n dengan suhu
g point pada
an arakidonat
-54°C dan -
ya kandungan
plasma kuda
kemungkinan

menyebabkan perbedaan kecepatan pembekuan antara ekstra dan intraseluler. Dengan *freezing point* asam lemak penyusun membran plasma yang lebih lama menyebabkan spermatozoa kuda lebih mudah rusak pada saat pembekuan dibandingkan dengan spermatozoa sapi ataupun domba.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa krioprotektan DMF dan gliserol menunjukkan kemampuan melindungi spermatozoa kuda dari efek pembekuan lebih baik jika dibandingkan dengan kombinasi gliserol dan etilen glikol pada pengencer skim trehalosa.

DAFTAR PUSTAKA

AISEN, E.G, H.L. ALVAREZ, A. VENTURINO and J.J. GARDE. 2000. Effect trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.

ALVARENGA, M.A., K.M. LEÃO, F.O. PAPA, F.C. LANDIM-ALVARENGA, A.S.L. MEDEIROS and G.M. GOMES. 2004. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos 2nd 5th October 2003. Brewster, Massachusetts: R. and W. Publications.

ALVARENGA, M.A, F.O. PAPA, F.C. LANDIM-ALVARENGA and A.S.L. MEDEIROS. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen. A Review. *Anim Reprod Sci.* 89: 105-113.

ANONIM. 2004. Bahan kursus Sperm Quality Assesment. Asia Link, Bogor: September 8-22.

ANONIM. 2006. Freezing depression. http://members.aol.com/profchm/ fpdepres. html. [2 Juli 2006].

ARIFIANTINI, R.I., T.L. YUSUF dan B. PURWANTARA. 2006. Daya tahan spermatozoa kuda hasil sentrifugasi dengan kadar plasma semen yang berbeda menggunakan pengencer skim. *J. Anim. Prod.* 8 : 160-167.

BEST, B. 2006. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling Injury in Cryonics. http://www.benbest.com/cryonics/viabel.html. [1 September 2006].

BERNDTSON, W.E. and R.H. FOOTE. 1972. Bovine sperm cell volume at various intervals after addition of glycerol at 5°C. *Cryobiology* 9: 29-33.

CHOW, P.Y.W., I.G. WHITE and B.W. PICKETT. 1986. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Anim. Reprod. Sci* 11: 207-213.

COLENBRANDER, B., A.R. FAZELI, A. VAN BUITEN, J. PARLEVLIET and B.M. GADELLA. 1992. Assesment of sperm cell membran integrity in the horse. *Acta Vet. Scand. Suppl.* 88: 49-58.

DOWSETT, K.F. and L.M. KNOTT. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46: 397 – 412.

GADELLA, B.M, R. RATHI, J.F.H.M. BROUWERS, T.A.E. STOUT and B. COLENBRANDER. 2001. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim. Reprod. Sci* 68: 249-265.

HAFEZ, E.S.E. 1993. Semen evaluation in HAFEZ, E.S.E, Reproduction in Farm Animals. 6th ed. Philadelphia: Lea and Febiger.

HENRY, M, P.P.N. SNOECK and A.C.P. COTTORELLO. 2002. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectant. *Theriogenology* 58: 245-248.

GARNER, D.L. and B. HAFEZ. 2000. Seminal plasma and spermatozoa. In HAFEZ, E.S.E, and HAFEZ, B. Reproduction in Farm Animals 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams dan Wilkins.

KACKER, R.N. and B.S. PAMVAR. 1996. Text Book of Equine Husbandry. 1st ed. New Delhi: Vikas Publishing House PVT LTD.

KENNEY, R.M, R.V. BERGMAN, W.L. COOPER and G.W. MORSE. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. Proc. Am. Assoc. Equine Practnr. pp. 327-336.

LINFOR, J.J., A.C. POMMER and S.A. MEYERS. 2002. Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm. *Theriogenology* 58: 355-358.

MEDEIROS, A.S.L., G.M. GOMES, M.T. CARMO, F.O. PAPA and M.A. ALVARENGA. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58: 273-276.

MEREDITH, M.J. 1995. Animal Breeding and Infertility. London: Blackwell Science.

MEYERS, S.A, F. TABLIN and J.H. CROWE 2004. Does Cellular Injury Resulting From Cryopreservation Share Traits With Sperm Capacitation? Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos 2nd- 5th October 2003. Brewster, Massachusetts: R. and W. Publications.

MOREL, D.M.C.G. 1999. Equine Artificial Insemination. Wallingford: CABI Publishing.

MOTTERSHEAD, J. 1999. Some Tips and Discussion about Centrifuging Semen. http://www.Equine-reproduction.com/articles/centrifuging/index.htm. [4 September 2004].

MOTTERSHEAD, J. 2000. Frozen semen preparation and use. http://www.equine-reproduction.com/articles/estrous.html [dikunjungi 4 September 2004].

PARK, J.E. and J.K. GRAHAM. 1992. Effect of cryopreservation procedur on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.

PARISH'S, J. 2003. Web site University of Wisconsin Department of Animal Science for his Animal Sciences

Reproductive Physiology class http://www.wisc.edu/ansci_repro/ [25 Juli 2003].

RUDOLPH, A.S. and J.W. CROWE. 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 22: 367-377.

SQUIRES, E.L., S.L. KEITH and J.K. GRAHAM. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1056–1065.

VANDERJAGT, D.J., M.R. TRUJILLO, F.D. THOMAS, Y.S. HUANG, L.T. CHUANG and R.H. GLEW. 2003. Phase angle correlates withn-3 fatty acids and cholesterol in red cells of Nigerian children with sickle cell disease. *Lipids Health Dis.*; 2: 2. Published online 2003 May 6. Doi: 10.1186/1476-511X-2-2.

VIDAMENT, M., C. DAIRE, J.M. YVON, P. DOLIGEZ, B. BRUNEAU, M. MAGISTRINI and P. ECOT. 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and /or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58: 249-251.

WALPOLE, R.E. 1995. Pengantar Statistika. Edisi ke 3. Terjemahan. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

WHITE, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.

YILDIZ, C., A. KAYA, M. AKSOY and T. TEKELI. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility. viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54:579-585.

DAFTAR ISI