Media Peternakan, Agustus 2007, hlm. 100-105 Vol. 30 No. 2
ISSN 0126-0472
Terakreditasi SK Dikti No: 56/DIKTI/Kep/2005

Kualitas Semen Beku Kuda dalam Pengencer Susu Skim dan Dimitropoulos dengan Dimetilformamida Sebagai Krioprotektan

I. Arifiantini, I. Supriatna & Aminah
Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, email : iis_arifiantini@telkom.net
(Diterima 05-01-2007; disetujui 06-06-2007)

ABSTRACT

Equine semen are far less tolerant in the freezing and thawing process than bull semen. The stallion spermatozoa are known susceptible to cold-shock relating with the content of their fatty acid on the plasma membrane. The extender is one of determining factors in the success of stallion semen cryopreservation, as an energy source and protector the cell from harmfull effect of cold shock. The common cryoprotective agent (CPA) for mammalian spermatozoa was glycerol, but for stallion semen cryopreservation, dimethyl formamide (DMF) was more suitable. This research was conducted to compare the success of the stallion semen cryopreservation in skim milk and dimitropoulos (DV) extender with DMF as cryoprotectant. Semen from three sexualy mature stallions was collected twice a week using an artificial vagina. Semen was evaluated macro- and microscopically and then divided into two tubes, diluted each of them with skim milk dan DV extender (1:1), centrifuged at 3 000 rpm for 15 minutes. The supernatant was removed and the pellet (spermatozoa) was re-diluted in skim DMF (SDMF) and DVDMF extender with the concentration of spermatozoa was 200×10^6 ml^{-1}. The semen then packed in 0.3ml minitub straw equilibrated for two hours at 4-5^{o}C and frezee in liquid N_2 vapor for 10 minutes. The assessment of sperm quality was conducted based on the percentage of sperm motility and viability. In this research, post-thawed semen in DVDMF showed the percentages of the motility (36.2%) and the viability (59.3%) higher ($P<0.05$) than SDMF (28.5 and 48.0 %). In conclusion, the DVDMF extender provided better post-thawed semen quality than SDMF.

Key words: cryopreservation, stallion semen, skim, dimitropoulos, dimethyl formamide

PENDAHULUAN

Pengolahan semen beku perlu memperhatikan beberapa faktor diantaranya pengencer dan krioprotektan yang tepat sehingga dapat melindungi spermatozoa dari efek pembekuan. Pengencer semen harus mengandung sumber nutrisi, larutan penyangga, bahan anti *cold shock*, krioprotektan, dan antibiotika (Ijaz & Ducharme, 1995). Bahan pengencer semen beku kuda yang paling sering digunakan adalah *non fat dairy skim milk* (Kenney *et al.,*1975) dan Dimitropoulos (DV) dengan sumber bufer berupa sitrat dengan sumber karbohidrat yang banyak digunakan adalah glukosa (Ijaz & Ducharme, 1995).

Krioprotektan berdasarkan cara kerjanya dikelompokkan menjadi *penetrating* (bekerja di dalam dan di luar sel) dan *non-penetrating* (hanya di luar sel) (Best, 2006). Berdasarkan bahan yang terkandung di dalamnya, krioprotektan dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu alkohol (etilen glikol, gliserol, dan lain-lain) dan amida (asetamid, metilformamid, dimetilformamida, dan lain-lain) (Alvarenga *et al.,* 2005).

Krioprotektan yang umum digunakan pada mamalia adalah gliserol. Penggunaan amida seperti dimetilformamida (DMF) sebagai krioprotektan alternatif pada semen kuda mulai dilaporkan pada tahun 2000an. Penelitian yang membandingkan penggunaan gliserol dan DMF telah banyak dilakukan. Vidament *et al.* (2002) membandingkan *fertilizing ability* spermatozoa kuda yang dibekukan dengan krioprotektan gliserol dan DMF. Ternyata penggunaan gliserol dan DMF dengan konsentrasi 2% menunjukkan angka kebuntingan pada kuda yang tidak berbeda nyata yaitu masing-masing 46% dan 50%. Medeiros *et al.* (2002) melaporkan bahwa konsentrasi DMF 5% lebih mampu mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa kuda dibandingkan dengan gliserol dan metilformamid (MF) pada konsentrasi yang sama. Pada tahun 2003 Medeiros dan kawan-kawan melakukan inseminasi buatan (IB) menggunakan semen kuda Mangalarga yang dibekukan dengan krioprotektan gliserol dan DMF (Alvarenga *et al.,* 2005). Ternyata tidak terjadi kebuntingan (0%) pada kuda-kuda yang di IB dengan semen beku menggunakan gliserol tetapi yang di IB menggunakan semen beku dengan krioprotektan DMF menunjukkan kebuntingan 40%. Percobaan lainnya dilakukan menggunakan semen beku dalam pengencer Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) dengan krioprotektan gliserol dan DMF (Moffet *et al.,* 2003). Pengencer yang mengandung gliserol maupun DMF motilitas sama-sama dapat dipertahankan, akan tetapi angka kebuntingan kuda yang diinseminasi dengan pengencer yang mengandung gliserol hasilnya 14% lebih rendah dibandingkan dengan DMF (47%). Hal ini menunjukkan bahwa gliserol dapat menurunkan fertilitas semen beku meskipun motilitas dan viabilitasnya dapat dipertahankan.

Squires *et al.* (2004) menyebutkan bahwa toksisitas osmotik gliserol lebih tinggi dibandingkan dengan DMF karena bobot molekul gliserol lebih besar yaitu 92 sedangkan DMF hanya 73. Hasil ini diperkuat dengan laporan Alvarenga *et al.* (2004) yang menemukan bahwa 80% spermatozoa kuda yang dibekukan menggunakan DMF dapat mencapai motilitas setelah *thawing* >40%, sedangkan menggunakan gliserol hanya 38%. Semen kuda yang tidak tahan dibekukan (*bad freezer*), dengan menggunakan krioprotektan gliserol umumnya hanya mencapai motilitas setelah *thawing* 11%, tetapi pada semen kuda yang sama jika krioprotektannya diganti dengan DMF hasilnya menjadi lebih baik dan dapat mencapai motilitas setelah *thawing* hingga 38% (Alvarenga *et al.,* 2005).

Penelitian-penelitian yang membandingkan penggunaan gliserol dan DMF umumnya menggunakan pengencer dasar skim, pada penelitian ini digunakan dua pengencer dasar yaitu skim dan DV dengan tujuan untuk membandingkan keberhasilan kriopreservasi semen kuda pada pengencer skim dan DV dengan menggunakan DMF sebagai krioprotektan.

MATERI DAN METODE

Ternak Penelitian

Sampel semen diambil dari satu ekor generasi empat (G4) *Thoroughbred*, satu ekor *American pinto,* dan *Swedish warmblood*, yang berbadan sehat, berumur antara 5 dan 8 tahun, memiliki kualitas produksi spermatozoa harian terbaik, milik Athena *stable*, Cinere-Depok. Kuda yang digunakan dikandangkan secara individu dengan pakan konsentrat dan dedak, rumput yang dilayukan, dan air minum *ad libitum.*

Pengencer Semen

Bahan pengencer yang disiapkan adalah pengencer susu skim dan DV. Pengencer susu skim yaitu: (1) Pengencer dasar sentrifugasi terdiri atas skim glukosa (Kenney *et al.*, 1975) skim 2,4 g (Tropicana slim, plain) dan glukosa 4 g dalam milli-Q *water ad* 100 ml. Campuran dipanaskan pada suhu 92-95°C selama 10 menit, didinginkan dan disaring. (2) Pengencer semen beku susu skim adalah pengencer dasar untuk sentrifugasi yang disuplementasi trehalosa 50 mM (Sigma, Chemical Co. St. Louis, Mo, USA), dan 5% DMF.

Bahan pengencer Dimitropoulos (DV) (Ijaz & Durchame, 1995) yaitu: (1) larutan sentrifugasi DV yang terdiri atas larutan A dan larutan B. Larutan A terbuat dari glukosa 12 g; fruktosa 12 g dan milli-Q *water ad* 600 ml. Campuran dipanaskan dalam penangas air sampai suhu 95°C selama 15 menit, kemudian setelah dingin disimpan dalam lemari es paling lama 1 minggu. Larutan B terbuat dari sodium sitrat; glisin 9,4 g sulfanylamide 3,5 g dan milli-Q *water ad* 1000 ml dipanaskan sampai 100°C dan disimpan pada suhu ruang paling lama 1 minggu. Pengencer dasar DV untuk sentrifugasi dibuat sebagai berikut : larutan A 30%, larutan B 50% dan kuning telur 20%. Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi dan diambil supernatannya. (2) Pengencer semen beku DV terdiri atas laktosa 11% 50 ml (w/v), glukosa EDTA 25 ml (Glukosa 60 g; sodium sitrat 3,70 g; Na2 –EDTA 3,70 g; NaHCO3 1,20 g dan milli-Q water *ad* 1000 ml), kuning telur 20 ml, equex *(orvus es paste* Novo, USA) 0.5 ml. Ke dalam pengencer semen beku DV juga disuplementasi trehalosa 50 mM dan krioprotektan DMF 5%. Pengencer untuk sentrifugasi maupun untuk pembekuan keduanya diberi antibiotik streptomisin 100 mg (Meiji, Japan) dan penisilin 100 000 IU (Meiji, Japan). Semua bahan kimia yang digunakan menggunakan produk Merck, KgaA, Darmstadt, Germany kecuali trehalosa, equex dan antibiotik.

Koleksi dan Perlakuan Semen

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan tipe Nishikawa dengan modifikasi tabung penampung tipe Missouri (Arifiantini *et al.,* 2006). Pada botol penampung dipasang penyaring berupa kain kasa agar fraksi gel tersaring. Evaluasi makroskopik dilakukan terhadap volume (ml), konsistensi, warna, dan pH dengan kertas indikator pH. Pengamatan mikroskopik dilakukan terhadap persentase motilitas spermatozoa (% SM), spermatozoa hidup (% SH) dengan pewarnaan eosin-nigrosin, konsentrasi spermatozoa ($x10^6$ ml^{-1}) dihitung menggunakan *Neubauer chamber* dengan pengenceran 100 kali dalam NaCl 3%, dan morfologi spermatozoa (normalitas) dilakukan dengan pewarnaan Williams.

Pengolahan lebih lanjut dilakukan pada semen segar yang memenuhi karakteristik sebagai berikut: % SM, % SH dan morfologi spermatozoa normal > 65% dengan konsentrasi spermatozoa > 200 $x10^6$ ml^{-1}.

Semen dibagi ke dalam dua tabung dan masing-masing ditambahkan pengencer dasar skim dan DV dengan perbandingan 1:1. Semen yang telah diberi pengencer dasar kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifus *portable* (Hettich, EBA 3S Tuttlingen, Jerman) dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit (Arifiantini *et al.,* 2006). Supernatan lalu dibuang dan endapan dilarutkan kembali dengan pengencer sesuai perlakuan. Semen kemudian dikemas menggunakan straw minitub 0,3 ml dan disusun dalam kaset, diekuilibrasi pada suhu 4-5°C selama 2 jam. Pembekuan dilakukan dalam uap N_2 cair dengan jarak 4 cm dari permukaan N_2 cair selama 10 menit pada *styrofoam* berukuran 5 L. Selanjutnya semen beku disimpan dalam kontainer N_2 cair selama 24 jam. *Thawing* dilakukan dalam air hangat (37°C) selama 30 detik. Pengamatan kualitas

Tabel 1 Karakteristik semen segar

Parameter	Hasil
Volume bebas gel (ml)	27,7±10,1
Konsistensi	Encer
Warna	Putih keruh
pH	7,0±0,1
Motilitas (%)	67,5±7,2
Viabilitas (%)	78,4±7,7
Konsentrasi (10^6 ml^{-1})	222,7±18,1
Morfologi spermatozoa normal (%)	74,2±3,3

dilakukan pada semen segar, setelah pengenceran, ekuilibrasi, dan *thawing*.

Keberhasilan pembekuan juga dinilai dengan *Recovery rate* (RR) yaitu persentase spermatozoa yang berhasil pulih dari proses pembekuan yang dihitung dengan membandingkan persentase spermatozoa motil pada semen segar dan setelah *thawing* (Hafez, 1993).

$$RR = \frac{\textit{Persentase spermatozoa motil setelah thawing}}{\textit{Persentase spermatozoa motil semen segar}} \textit{ x 100\%}$$

Penelitian dirancang menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan 4 ulangan (Walpole 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kualitas semen segar yang cukup baik (Tabel 1). Semua karakteristik semen segar tersebut berada pada kisaran normal berdasarkan Morel (1999). Meskipun volume bebas gel yang diperoleh hanya 27,73±10,10 ml atau lebih rendah dari volume normal berdasarkan Morel (1999) yaitu 30-300 ml, volume ini masih dalam batas normal menurut Hunter (1995) yaitu 18-170 ml dan Meredith (1995) yaitu 15-100 ml.

Kualitas Semen Beku Kuda pada Pengencer SDMF dan DVDMF

Spermatozoa kuda sangat mudah rusak sehingga pengencer dan krioprotektan yang tepat mutlak dibutuhkan. Peranan krioprotektan sangat penting dalam melindungi sel selama proses pembekuan. Rendahnya suhu pembekuan menyebabkan terjadinya kristal es yang dapat merusak struktur membran plasma. Krioprotektan intraseluler yang digunakan dalam penelitian ini akan bekerja mencegah pembentukan kristal es di dalam dan di luar sel saat pembekuan (Best, 2006). Selain dapat melindungi sel pada saat pembekuan krioprotektan juga bersifat toksik terhadap sel terutama pada saat ekuilibrasi dan setelah *thawing*. Oleh karena itu, kombinasi krioprotektan dengan pengencer sangat penting dalam menentukan keberhasilan kriopreservasi.

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pengencer DVDMF menghasilkan kualitas setelah *thawing* lebih baik dibandingkan dengan SDMF. Persentase motilitas spermatozoa pada DVDMF adalah 36,2% sedangkan pada SDMF hanya 28,5% ($P<0,05$). Hal ini juga terlihat dari nilai % SH, dimana pada pada DVDMF menunjukkan nilai SH 59,3% nyata lebih tinggi dibandingkan dengan SDMF yang hanya 48,0% ($P<0,05$) (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase spermatozoa motil (%SM) dan spermatozoa hidup (%SH) pada berbagai tahap pembekuan dalam pengencer SDMF dan DVDMF

Parameter	SDMF	DVDMF
Semen segar		
%SM	67,5±7,2	67,5±7,2
%SH	78,4±7,7	78,4±7,7
Setelah ekuilibrasi		
%SM	57,5±8,9	57,0±9,8
%SH	68,3±7,2^{b}	71,3±7,6^{ab}
Setelah *thawing*		
%SM	28,5±5,6^{d}	36,2±7,3^{c}
%SH	48,0±10,3^{ef}	59,3±12,1^{dc}
RR (%)	42,2	53,6

Keterangan: superskrip berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

Berdasarkan pengamatan kualitas spermatozoa pada setiap tahapan pembekuan, terjadi penurunan kualitas mulai dari semen segar, setelah ekulibrasi, dan setelah *thawing*. Penurunan kualitas dari setelah pengenceran ke setelah ekuilibrasi masih rendah. Pada pengencer SDMF penurunan %SM dan %SH antara 10,0% dan 10,1%, sedangkan pada DVDMF antara 10,5% dan 7,1%. Setelah ekuilibrasi hingga setelah *thawing* penurunan %SM dan %SH cukup tinggi, yaitu antara 29,0% dan 20,3% pada SDMF serta antara 20,8 dan 12 % pada DVDMF. Sehingga secara keseluruhan total penurunan %SM dan %SH untuk SDMF dan DVDMF masing-masing adalah 39,0%; 30,4% dan 31,3%; 19,1%.

Keberhasilan pembekuan tidak hanya dilihat dari kualitas semen setelah *thawing* tetapi juga dari jumlah spermatozoa yang berhasil pulih dari proses pembekuan yang disebut *recovery rate* (RR). Nilai RR yang menggunakan pengencer DVDMF lebih tinggi (53,6%) dibandingkan dengan SDMF (42,2%), sehingga dapat simpulkan bahwa spermatozoa yang dibekukan menggunakan pengencer DVDMF lebih banyak yang berhasil pulih setelah proses pembekuan.

Kualitas semen yang paling dipengaruhi oleh efek pembekuan adalah motilitas, hal ini terlihat dari tingginya persentase penurunan dari semen segar ke motilitas setelah- *thawing*. ATP yang dibentuk oleh mitokondria yang terdapat pada bagian *midpiece* diperlukan untuk melakukan motilitas spermatozoa. Membran plasma pada bagian *midpiece* ini lebih mudah rusak akibat pembekuan sehingga pembentukan ATP dari glukosa gagal dilakukan, dan spermatozoa akan kehilangan kemampuan untuk bergerak.

Keunggulan pengencer DVDMF dibandingkan dengan SDMF kemungkinan disebabkan oleh komposisi di dalam pengencer tersebut yang lebih lengkap, antara lain kandungan glukosa, fruktosa dan trehalosa, bahan penyangga sitrat, dan kuning telur yang di dalamnya terkandung fosfolipida. Pengencer yang mengandung lipida dapat mencegah kerusakan membran selama pembekuan (Ricker *et al.,* 2005). Keberadaan equex (*Orvus es paste*) juga dipercaya bisa menyimpan lebih banyak lipida dari kuning telur di dalam pengencer. Selain itu di dalam pengencer DV juga terdapat EDTA yang berfungsi sebagai kelator kalsium (Crabo, 2001).

Dilihat dari tekanan osmotik, DVDMF (1158 mOsm kg^{-1}) lebih rendah dibandingkan dengan SDMF (1234 mOsm kg^{-1}). Menurut Meyers *et* *al.* (2004) toleransi osmolaritas pengencer untuk semen kuda berkisar antara 150 dan 900 mOsm kg^{-1}. Berdasarkan hal tersebut pengencer yang menunjukkan tekanan osmotik yang lebih mendekati ambang toleransi osmolaritas semen kuda (900 mOsm kg^{-1}) adalah pengencer DVDMF.

KESIMPULAN

Pengencer DVDMF merupakan kombinasi yang lebih baik dibandingkan dengan SDMF. Nilai RR pada pengencer DVDMF 53,6% dan SDMF 42,2%.

DAFTAR PUSTAKA

Alvarenga, MA, K.M. Leao, F.O. Papa, F.C.L. Alvarenga, A.S.L. Medeiros & G.M. Gomez. 2004. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos. 2003. Massachusetts. Havemeyer Foundation Monograph Series. 12:74-76.

Alvarenga, M.A, F.O. Papa, L.F.C. Alvarenga & A.S.L. Medeiros. 2005. Amides as cyoprotectants for freezing stallion semen: A Review. Anim. Reprod. Sci. 89:105-113.

Arifiantini, R.I, T.L. Yusuf & B. Purwantara. 2006. Daya tahan spermatozoa kuda hasil sentrifugasi dengan kadar plasma semen yang berbeda menggunakan pengencer skim. Jurnal Animal Production Vol. 8: 160-167.

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

Crabo, Bo. G. 2001. Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. AAEP Proceeding Vol. 47 : 291-294.

Hafez, E.S.E. 1993. Semen Evaluation. In: E.S.E. Hafez (Ed.). Reproduction in Farm Animal. 6th Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.

Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknik Reproduksi Hewan Betina Domestik. Terjemahan: Putra H. ITB dan Univ Udayana, Bandung.

Ijaz, A. & R. Ducharme. 1995. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. Theriogenology 44:1039-1050.

Kenney RM, R.V. Bergman, W.L. Cooper & G.W. Morse. 1975. Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. Proc. Am. Assoc. Equine Practnr : 327-336.

Medeiros, A.S.L, G.M. Gomes, M.T. Carmo, F.O. Papa & M.A. Alvarenga. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. Theriogenology 58:273-276.

Meredith, M.J. 1995. Animal Breeding and Infertility. Blackwell Sci., London.

Meyers, S.A, F. Tablin & J.H. Crowe. 2004. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? In: Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos. 2003. Massachusetts. Havemeyer Foundation Monograph Series. 12:70-73.

Moffet, P.D, J.E. Bruemmer, C. Card & E.L. Squires. 2003. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference, P 42 (Abstract).

Morel, D.M.C.G. 1999. Equine Artificial Insemination. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK.

Ricker, J.V., J.J. Linfor, W.J. Delfino, P. Kysar, E.L. Scholtz, F. Tablin, J.H. Crowe, B.A. Ball & S.A. Meyers. 2005. Equine sperm membrane phase behaviour: the effects of lipid based cryoprotectant. Biol. Reprod. 74:359-365.

Squires, E.L, S.L. Keith & J.K. Graham. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology 62:1056-1065.

Vidament, M., C. Daire, J.M. Yvon, P. Doligez, B. Bruneau, M. Magistrini & 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. 3rd ed. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.