Jurnal Veteriner Juni 2009
ISSN : 1411 - 8327

Vol. 10 No. 2 : 63-70

Kualitas Semen Beku Kuda pada Pengencer Susu Skim dengan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda

(THE STALLION FROZEN SEMEN QUALITY IN THE SKIM MILK EXTENDER WITH VARIOUS GLYCEROL CONCENTRATION)

Azizah, Raden Iis Arifiantini✉

Laboratorium Fisiologi dan Inseminasi Buatan, Bagian Reproduksi dan Kebidanan
Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680.
email : Iis_arifiantini @telkom.net

ABSTRACT

Cryoprotectant is one of determining factors for the success of stallion semen cryopreservation. For most mammalian sperm cryopreservation,glycerol has been widely used as the cryoprotectant. Glycerol in high concentration is toxic to the sperm but in low concentration it has protective effect on the semen. The objectives of this experiment were to find appropiate glycerol concentration by using skim milk extender in order to maintain motility and viability of spermatozoa of stallion frozen semen. Semen was collected from three sexually mature stallions by using artificial vagina. The semen characteristics and quality were examined both macro and microscopically. Prior to extension, semen was centrifugated at 3000 rpm for 15 minutes. The pellet was re-extended with skim milk extender with glycerol 5% (G_5) 7.5% ($G_{7.5}$), and 10% (G_{10}). The extended semen as then packed in mini straw (0.3ml), equilibrated at 5 °C for 2 hours, frozen in the liquid N_2 vapor for15 minutes and then stored in liquid N_2 container until futher evaluation. The frozen semen, was thawed at 37 °C for 30 seconds. The percentages of sperm motility and viability were examihed. The result of this research showed that the sperm motility and viability in G_5 was (23.8 %; 35.6 %) significantly hihger (P<0.05) as compare a with $G_{7.5}$ (18.1%; 28.6%) and G_{10}. (11.8%; 23.1%). The recovery Rate in G_5 (35.4%) was significant high er (P<0.05) than $G_{7.5}$ (26.9%) and G_{10} (17.6%). In conclusion, glicerol of 5% is recomended for cryopreservation of stallion semen extended with skim milk.

Key words: Glycerol, frozen semen, stallion.

PENDAHULUAN

Kuda merupakan salah satu komoditas ternak pendukung pembangunan peternakan, tetapi saat ini jumlahnya cenderung menurun. Penerapan inseminasi buatan (IB) pada kuda merupakan salah satu usaha untuk meningkatkan populasi kuda. Inseminasi dapat dilakukan dengan menggunakan semen cair mau pun semen beku. Semen beku atau *frozen semen* adalah semen yang disimpan pada suhu di bawah titik beku (-79 °C sampai –196 °C). Semen beku mempunyai kelebihan karena dapat disimpan lebih lama, sehingga memungkinkan dilakukan perkawinan yang selektif dimana saja dan setiap waktu (Kacker dan Panwar, 1995), mengurangi resiko buruk dan stress pada kuda betina serta menurunkan biaya transportasi (Anon, 2002).

Dibandingkan dengan semen sapi dan domba, semen kuda lebih rentan terhadap proses pembekuan dan *thawing* serta bervariasi antar individu (Anon, 2006). Di samping itu kemampuan spermatozoa kuda 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). Secara umum pada saat pembekuan semen mengalami penurunan kualitas sekitar 10 – 40% (Parrish's, 2003) hingga 50% (Sorensen, 1987). Agar spermatozoa dapat bertahan terhadap proses pembekuan, perlu ditambahkan krioprotektan dalam pengencernya. Salah satu jenis krioprotektan yang sering digunakan pada mamalia adalah gliserol. Gliserol dapat masuk ke dalam sel spermatozoa untuk mengikat sebagian air bebas, sehingga kristal-kristal es yang terbentuk di dalam medium pengencer pada waktu pembekuan dapat dicegah.

Konsentrasi gliserol yang digunakan berbeda tergantung jenis semen serta pengencer yang digunakan. Penambahan 0,55 M gliserol ke dalam pengencer susu skim-kuning telur mampu menghasilkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih tinggi (61%) dibandingkan jika ditambahkan *dimetilformamide* (DMF) (38%) pada konsentrasi yang sama. Namun, jika konsentrasi gliserol ditingkatkan (0,6 M atau 0,9 M) justru akan menurun motilitasnya menjadi hanya 52% (Squires *et al.*, 2004). Pada semen beku kambing peranakan etawah (PE) konsentrasi gliserol 6% dalam pengencer Tris lebih baik dibandingkan gliserol 5 dan 7% (Tambing, 1999). Konsentrasi gliserol yang optimum pada semen beku kambing menggunakan pengencer susu skim adalah 14%, jika menggunakan Tris fruktosa dan asam sitrat 4-7 % atau 4-4½ % (Ritar *et al.*, 1990). Pada semen beku sapi, dengan pengencer Tris konsentrasi gliserol yang digunakan adalah 6,4% (Correa *et al.*, 1996; Arifiantini dan Yusuf, 2006). Pada semen beku rusa, penambahan konsentrasi gliserol 10% lebih baik dibandingkan dengan 8% dan 6% pada pengencer Tris-glukosa dan Tris-sukrosa (Nalley, 2006).). Sedangkan Yildiz *et al.*, (2000) melaporkan konsentrasi gliserol terbaik untuk pembekuan semen anjing pada pengencer Tris adalah 8%. Hasil tersebut memperkuat pernyataan yang disampaikan oleh Salisbury dan Vandemark (1984); Fahy (1986); dan Hafez (2000) yaitu gliserol bersifat toksik pada konsentrasi yang tinggi, sebaliknya jika konsentrasi yang digunakan terlalu rendah maka daya protektifnya akan berkurang.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi gliserol paling tepat pada pengencer skim glukosa dalam mempertahankan motilitas serta viabilitas spermatozoa pada pembekuan semen kuda.

METODE PENELITIAN

Sumber Semen

Sumber semen diperoleh dari tiga ekor kuda jantan yaitu jantan 1 Generasi (G4) *Thoroughbred*, jantan 2 *(American pinto)* dan jantan 3 *(Swedish warmblood)* yang sudah dewasa kelamin. Ketiga kuda tersebut hasil seleksi dengan kriteria sehat, berumur antara 5 dan 8 tahun dan teruji menunjukkan kualitas terbaik dari evaluasi produksi spermatozoa harian *(daily sperm out put)*

Pengencer Semen

Pengencer yang disiapkan meliputi a). Pengencer dasar untuk sentrifugasi terbuat dari susu skim (Tropicana slim, rasa plain) 2,4 g dan glukosa 4 g (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) yang dilarutkan dengan akuades sampai 100 ml. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 92-95°C selama 10 menit, didinginkan dan ditambahkan antibiotik penisilin sebanyak 100,000 IU serta streptomisin sebanyak 100 mg b). Pengencer untuk pembekuan adalah pengencer dasar yang masing-masing mengandung gliserol 5% (G_5), 7,5% ($G_{7.5}$), dan gliserol 10% (G_{10}).

Koleksi dan Perlakuan semen

Koleksi semen dilakukan dua kali dalam satu minggu menggunakan vagina buatan tipe Nishikawa yang dimodifikasi dengan tabung penampung tipe Misouri (Arifiantini *et al.*, 2006). Untuk menyaring fraksi gel pada mulut botol penampung dilengkapi dengan kain kasa. Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopik, meliputi warna, volume, derajat keasaman (pH), serta secara mikroskopik meliputi persentase motilitas, viabilitas, konsentrasi dan morfologi dari spermatozoa. Semen dengan motilitas 55%, konsentrasi >200x10^6 ml^{-1}, morfologi spermatozoa normal >70% diolah untuk semen beku. Segera setelah evaluasi semen dari masing-masing individu diencerkan dengan perbandingan 1:1 dengan pengencer susu skim kemudian disentrifugasi menggunakan sentrifus *portable* (Hetrich, EBA 3 S, Tuittlingen, Jerman) dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit (Arifiantini *et al.*, 2006). Supernatan dibuang dan endapan (spermatozoa) dilarutkan kembali dengan pengencer skim glukosa sesuai perlakuan yaitu G_5, $G_{7,5}$ dan G_{10}. Semen yang telah diencerkan dikemas ke dalam straw 0,25 ml, diekuilibrasi selama dua jam pada suhu 5 °C kemudian dibekukan pada uap nitrogen (N_2) cair menggunakan boks *styrofoam* ukuran 39 x 25 x 32 cm, selama 15 menit. Semen beku disimpan dalam kontainer N_2 cair untuk mengamatan lebih lanjut. Keberhasilan pembekuan dilakukan dengan mencairkan kembali semen beku (*thawing*) pada suhu 37 °C selama 30 detik.

Parameter dan Rancangan Percobaan

Parameter yang diukur adalah persentase motilitas yang dilakukan secara subjektif kuantitatif dari lima lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya listrik

(Olimpus CH 20) perbesaran 400 kali dengan kisaran 0-100% dengan skala 5% (Sorenson, 1989). Viabilitas (persentase spermatozoa hidup) dilakukan dengan pewarna eosin-nigrosin (Bark dan Oko, 1989), spermatozoa dihitung pada 10 lapang pandang secara acak, kepala spermatozoa yang tidak terwarnai menunjukkan bahwa spermatozoa hidup dan yang terwarnai adalah spermatozoa yang mati. Keberhasilan pembekuan juga dinilai dari kemampuan spermatozoa yang dapat pulih kembali setelah pembekuan yang disebut dengan *recovery rate* (RR) (Hafez, 1993) yaitu :

$$RR = \frac{spermatoza \;\; motil \;\; setelah \;\; thawing}{spermatoza \;\; motil \;\; semen \;\; segar} x\ 100\ \%$$

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok (RAK). Dengan tiga perlakuan dan empat ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Volume semen (tanpa gel) yang diperoleh selama penelitian adalah 27,7±9,8 ml hampir sama dengan laporan Morel (1999) yang melaporkan volume semen dari *Thoroughbred, Standarbred, dan Quarterhorse* masing-masing 28,3 ml; 30,2 ml dan 23,8 ml. Warna semen putih-keruh dengan konsistensi encer. Derajat keasaman (pH) relatif netral, dengan rataan 7,1 ± 0,1. Hasil tersebut dalam kisaran normal semen kuda yaitu 6,20–7,80 (Morel, 1999). Rataan konsentrasi spermatozoa 222,9± 17,3 x10^6 ml^{-1}. Hasil ini berada dalam kisaran normal semen menurut Garner dan Hafez (2000) sebesar 150–300 x 10^6 ml^{-1}. Rataan persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa yang didapat adalah 67,1±7,2; 78,8±3,5 dan 26,4±4,7% (Tabel 1), hasil ini dalam kisaran spermatozoa yang normal menurut Garner & Hafez (2000).

Besarnya standar deviasi pada Table 1 menunjukkan kuatnya pengaruh bangsa kuda terhadap volume semen yang dikoleksi, karena ketiga pejantan berasal dari bangsa kuda yang berbeda. Hal tersebut sesuai dengan yang dilaporkan Dowsett dan Knott (1996) bahwa bangsa dan umur kuda berpengaruh terhadap kualitas semen kuda. Dalam penelitian ini, ketiga pejantan berada dalam kisaran umur yang sama yaitu lima sampai delapan tahun

Tabel 1 Karakteristik semen segar

Karakteristik semen	Rataan
Makroskopis	
Volume (ml)	27,7± 9,8
Warna	putih keruh
Konsistensi	encer
pH	7,1 ± 0,1
Mikroskopis	67,1 ± 7,5
Motilitas (%)	
Viabilitas (%)	78,8 ± 3,49
Morfologi spermatozoa	
abnormal (%)	26,4± 4,7
Konsentrasi spermatozoa	
(10^6/ml)	222,9 ± 17,3

Tabel 2 Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa semen segar masing-masing jantan

Jantan	Motilitas (%)	Viabilitas (%)
1	57,5±2,9	78,9±2,4
2	72,5±2,9	79,8±4,6
3	71,3±2,5	77,7±3,8

yang merupakan umur optimal untuk digunakan sebagai pejantan. Dari ketiga kuda tersebut jantan 1 (G4 *Thoroughbred*) mempunyai persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa semen segar paling rendah sedangkan jantan 2 dan 3 menunjukkan kualitas semen segar yang hampir sama (Tabel 2).

Kualitas Semen Setelah Ekuilibrasi dengan berbagai Konsentrasi Gliserol

Pengaruh faktor individu pada ketiga kuda jantan yang digunakan terlihat dari kualitas semen setelah diekuilibrasi pada suhu 5°C selama dua jam. Pada jantan 1 ekuilibrasi selama dua jam dalam pengencer skim yang mengandung berbagai konsentrasi gliserol, ternyata menurunkan persentase motilitas yang sangat nyata (P<0,05) yaitu 15% (G_5), 16,2% ($G_{7,5}$) dan sangat nyata (P<0,01) pada G_{10} yaitu 22,2%.

Pada jantan 2, pengencer skim yang mengandung konsentrasi gliserol 5% hanya menurun motilitasnya sebesar 2%, sedangkan pada konsentrasi $G_{7,5}$ dan G_{10} turun 6,3%. Jantan 3, menunjukkan toleransi yang sangat tinggi pada G_5, ditunjukkan dengan tidak berubahnya persentase motilitas setelah ekuilibrasi. Pada $G_{7,5}$ dan $G_{10,}$ menunjukkan penurunan motilitas masing-masing 2,5 dan 7,5% (Tabel 3).

Kualitas Semen setelah *Thawing* pada Pengencer Susu Skim dengan Berbagai Konsentrasi Gliserol

Semen kuda mempunyai toleransi yang rendah terhadap proses pembekuan dan *thawing* dibandingkan dengan semen sapi serta sangat bervariasi nilainya pada beberapa individu (Anon, 2006). Pada penelitian ini kualitas semen setelah *thawing* sangat bervariasi antar konsentrasi gliserol maupun antar individu kuda jantan yang digunakan. Tanpa melihat individu pejantan secara keseluruhan perbedaan konsentrasi gliserol yang diuji menunjukkan perbedaan kualitas yang nyata ($P<0,05$), demikian juga dengan penurunan kualitas dari semen segar dibandingkan dengan semen pasca ekuilibrasi atau pun pasca *thawing*.

Motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan konsentrasi G_5 pada jantan 2 (25,9±2,5; 40,5±3,8%) menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan jantan 1 (22,5±3,4; 34,4±4,8%) mau pun jantan 3 (22,9±2,6; 34,9±4,1%), dan tidak ada perbedaan kualitas setelah *thawing* pada ke dua jantan tersebut. Jantan 1 meskipun menunjukkan kualitas setelah *thawing* yang sama dengan jantan 3, bahkan lebih rendah dari jantan 2, tetapi karena memiliki kualitas semen segar yang paling rendah, maka mempunyai nilai RR yang paling tinggi yaitu 39,1% dibandingkan dengan jantan 2 (32,1%) atau jantan 3 (35,6%).

Motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah *thawing* pada konsentrasi $G_{7,5}$ ternyata pada jantan 2 (22,9±3,3; 32,4±5,7%) menunjukkan angka yang lebih tinggi dibandingkan dengan jantan 1 (13,3±2,5; 27,3±4,4%) atau jantan 3 (17,9±3,3; 26,0±4,9%). Demikian juga dengan nilai RR nya jantan 2 (31,6%) lebih tinggi dibandingkan dengan jantan 1 (23,1%) mau pun jantan 3 (24,7%). Motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah *thawing* pada konsentrasi G_{10} ternyata pada jantan 2 (15,4±7,6; 27,0±5,1%) juga menunjukkan angka yang lebih tinggi dibandingkan dengan jantan 1 (6,7±2,5; 17,1±4,4%) atau jantan 3 (13,3±2,5; 25,2 ±3,6%). Demikian juga dengan nilai RR pada jantan 2 (21,6%) lebih tinggi diikuti oleh jantan 3 (18,3%) dan jantan 1 (11,7%) (Tabel 5).

Pada Konsentrasi G_5 (61,3±14,2; 77,74±5,0%) dan $G_{7,5}$ (58,8±13,2; 54,6 ± 14,7%) menunjukkan motilitas dan viabilitas setelah ekuilibrasi yang sama, hamun lebih tinggi dibandingkan dengan G_{10} (54,6±14,7; 66,7±8,1%). Setelah *thawing* motilitas dan viabilitas pada G_5 (23,8±3,0; 36,6± 5,8 %) nyata lebih tinggi, diikuti oleh $G_{7,5}$ (18,1±5,0; 28,6±5,6%) dan G_{10} (11,80±4,5; 23,1± 5,9%). (Tabel 4). Selain kualitas setelah *thawing* lebih tinggi, Nilai RR pada G_5 (35,4±5,7%) juga nyata lebih tinggi dibandingkan dengan $G_{7,5}$ (26,9 ± 4,5 %) ataupun G_{10} (17,6 ± 4,4%) (Tabel 5).

Dalam proses pembekuan, spermatozoa akan mengalami perubahan tekanan osmotik akibat penambahan pengencer yang mengandung krioprotektan atau pun perubahan suhu. Perubahan suhu terjadi selama evaluasi

Tabel 3 Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi pada masing-masing jantan

Konsentrasi gliserol (%)	Jantan	Motilitas (%)	Viabilitas (%)
5	1	42,5 ± 2,9^{c}	71,7±6,6^{b}
	2	68,8±2,5^{b}	78,4±2,7^{a}
	3	72,5 ± 2,9^{a}	82,0± 3,1^{a}
	Rataan	61,3 ±14,2	77,4 ±6,0
7,5	1	41,3±2,5^{c}	64,0±4,2^{bc}
	2	65,0 ±0,0^{cb}	73,2± 2,2^{b}
	3	70,0± 0,0^{a}	75,4± 2,2^{ab}
	Rataan	58,8 ±13,2	70,8 ±5,8
10	1	35,0±4,1^{d}	56,4±4,3^{c}
	2	65,0±0,0^{cb}	71,9 ±2,0^{b}
	3	65,0±20,0^{cb}	71,9±2,1^{b}
	Rataan	54,6±14,7	66,7±8,1

Huruf berbeda yang yang mengikuti angka pada lajur dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$)

Tabel 4 Kualitas semen pada berbagai tahapan pembekuan dari ketiga kuda

Tahapan pembekuan	Konsentrasi gliserol		
	5%	7,5%	10%
Semen segar			
Motilitas (%)	67,1 ± 2,5[a]	67,1 ± 2,5a	67,1 ± 2,5a
Viabilitas (%)	78,8 ± 3,5[a]	78,8 ± 3,5a	78,8 ± 3,5a
Setelah ekuilibrasi			
Motilitas (%)	61,3 ± 14,2[b]	58,8 ± 13,2[b]	54,6 ± 14,7[bc]
Viabilitas (%)	77,74 ± 5,0[a]	70,81 ± 5,8[b]	66,7 ± 8,1[bc]
Setelah *thawing*			
Motilitas (%)	23,8 ± 3,0[d]	18,1 ± 5,0[e]	11,80 ± 4,5[f]
Viabilitas (%)	36,6 ± 5,8[d]	28,6 ± 5,6[e]	23,1 ± 5,9[ef]
RR (%)	35,4 ± 5,7[a]	26,9 ± 4,5[b]	17,6 ± 4,4[c]

Huruf berbeda yang yang mengikuti angka pada lajur dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Tabel 5 Persentase motilitas, viabilitas dan *recovery rate* spermatozoa setelah *Thawing* dari ke tiga kuda yang digunakan

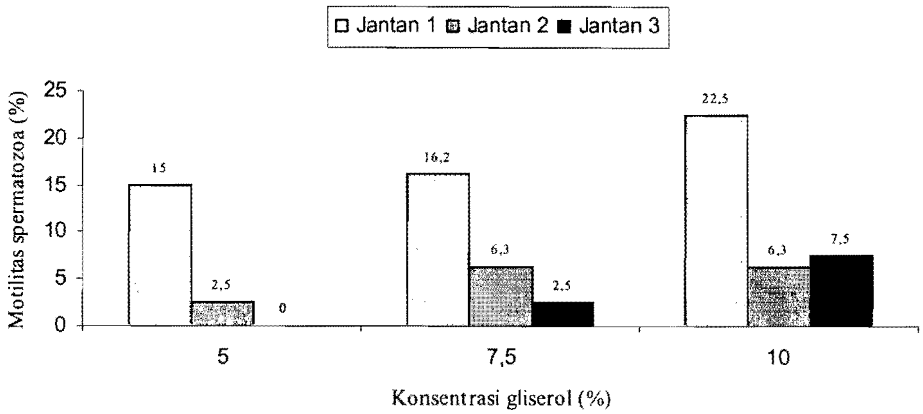
Konsentrasi gliserol (%)	Jantan	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	RR (%)
5	1	22,5±3,4[ab]	34,4±4,8[b]	39,1
	2	25,9±2,5[a]	40,5±3,8[a]	32,1
	3	22,9±2,6[ab]	34,9±4,1[b]	35,6
	Rataan	**23,8±3,0**	**36,6±5,0**	**35,7**
7,5	1	13,3±2,5[d]	27,3±4,4[c]	23,1
	2	22,9± 3,3[ab]	32,4± 5,7[b]	31,6
	3	17,9 ± 3,3[c]	26,0 ± 4,9[c]	24,7
	Rataan	**18,0±5,0**	**28,6±5,6**	**26,6**
10	1	6,7 ± 2,5[f]	17,1±4,4[e]	11,7
	2	15,4±7,6[cd]	27,0±5,1[c]	21,6
	3	13,3±2,5[d]	25,2 ±3,6[c]	18,3
	Rataan	**11,8±4,5**	**23,1±5,9**	**17,2**

Huruf berbeda yang yang mengikuti angka pada lajur dan baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

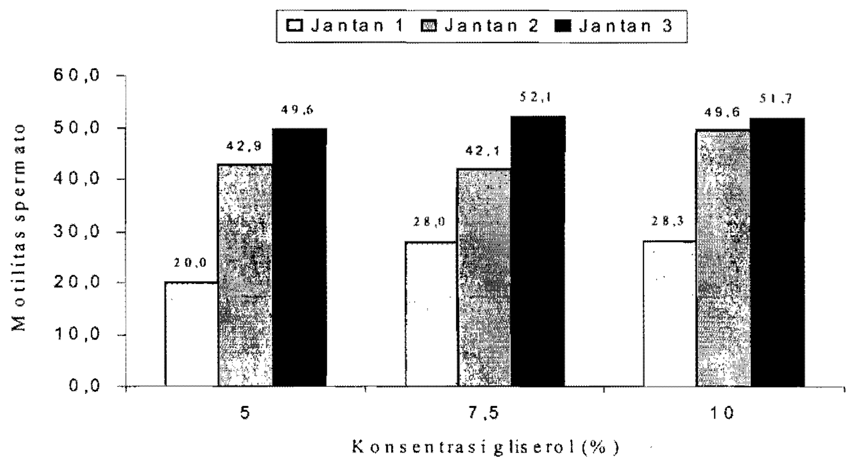
semen dalam suhu ruang dilanjutkan ekuilibrasi pada suhu 5°C, pembekuan dalam uap N_2 cair, penyimpanan dalam suhu -196°C ataupun saat *thawing* pada suhu 37°C. Semua perubahan tekanan osmotik atau pun suhu akan secara langsung mempengaruhi kualitas spermatozoa terutama motilitasnya. Penurunan motilitas spermatozoa mulai dari semen segar sampai setelah ekuilibrasi umumnya masih rendah. Pada semen kuda ternyata penurunan terjadi cukup tinggi dan bervariasi antar individu jantan.

Pada G_5 jantan 1 turun 15%, jantan 2 turun hanya 2,5% sedangkan jantan 3 tidak mengalami penurunan (0%). Pada $G_{7,5}$, motilitas spermatozoa jantan 1 turun 16,2%, jantan 2 turun sebanyak 6,3% dan jantan 3 juga turun 2,5%. Pada G_{10} penurunan cukup tinggi, pada jantan 1 sebanyak 22,5%, pada jantan 2 penurunan sama dengan pada $G_{7,5}$ yaitu hanya 6,3%, sedangkan pada jantan 3 turun 7,5% (Gambar 1).

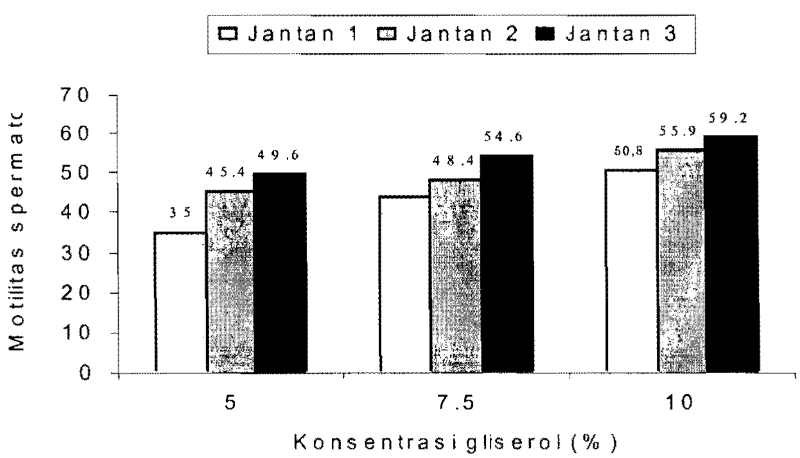
Penurunan motilitas spermatozoa dari setelah ekuilibrasi ke setelah *thawing* biasanya terjadi sangat tinggi. Hal ini disebabkan spermatozoa mengalami perubahan suhu yang ekstrim pada saat pembekuan atau pun pada saat pencairan kembali (*thawing*). Tanpa melihat individu pejantan, penurunan motilitas spermatozoa dari setelah ekuilibrasi ke setelah



Gambar 1 Penurunan persentase motilitas spermatozoa dari semen segar ke setelah ekuilibrasi



Gambar 2 Penurunan persentase motilitas spermatozoa dari semen setelah ekulibrasi ke setelah *thawing.*



Gambar 3 Penurunan persentase motilitas spermatozoa dari semen segar ke setelah *thawing*

thawing terjadi cukup tinggi yaitu 20-49,6% pada G_5, 28,0-52,1% pada $G_{7,5}$ dan 28,3-51,7% pada G_{10}. Secara individu tanpa melihat konsentrasi gliserol yang diberikan, jantan 1 menunjukkan penurunan yang paling rendah antara 20 dan 28,3%, jantan 2 antara 42,9 dan 49,6% sedangkan jantan 3 mengalami penurunan antara 49,6-52,1% (Gambar 2). Sehingga total penurunan kualitas dari semen segar sampai setelah *thawing* terjadi sangat tinggi yaitu 35-50,8% (jantan 1), 45,4-55,9 % (jantan 2) dan 49,6-59,2% (jantan 3) (Gambar 3).

Pada ketiga gambar yang disajikan, terlihat bahwa masing-masing individu mempunyai kecenderungan penurunan motilitas spermatozoa yang berbeda. Jantan 1 ternyata mengalami penurunan yang tinggi pada saat ekuilibrasi, tetapi lebih rendah pada saat pembekuan dan *thawing* dibandingkan dengan kedua jantan yang lain. Artinya pada jantan 1, waktu ekuilibrasi dapat dilakukan lebih singkat sehingga spermatozoa tidak terpapar terlalu lama dalam larutan yang mengandung gliserol, sedangkan pada kedua jantan lainnya ekuilibrasi selama 2 jam tidak terlalu berpengaruh.

Secara umum hasil pembekuan semen beku kuda hasil penelitian ini masih rendah. Konsentrasi gliserol secara umum yang paling cocok adalah 5%, sedangkan 7,5 dan 10%, kelihatannya terlalu tinggi pada pembekuan semen kuda tersebut. Hasil ini juga sesuai dengan pendapat Salisbury dan VanDemark (1984); Fahy (1986); dan Hafez (1993) yang melaporkan bahwa gliserol bersifat toksik pada konsentrasi yang tinggi. Gliserol yang digunakan sebagai krioprotektan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan oleh spermatozoa dipakai untuk metabolisme oksidatif, menggantikan air bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit, menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler serta mengurangi daya merusaknya terhadap sel spermatozoa. Efek gliserol adalah mencegah pengumpulan molekul H_2O dan mencegah kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (Mazur, 1980). Selain itu, gliserol akan menurunkan konsentrasi natrium medium di luar sel sehingga kematian sel spermatozoa akibat *solution-effect* dapat dihindarkan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa daya lindung terhadap spermatozoa pada $G_{7,5}$ dan G_{10} sangat rendah, yang ditandai dengan rendahnya persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah *thawing*. Hal tersebut kemungkinan gliserol dalam konsentrasi tersebut bersifat toksik, atau kemungkinan lain adalah tekanan osmotik dalam pengencer terlalu tinggi sehingga air dari dalam sel akan tertarik keluar sehingga mennyebabkan terjadi dehidrasi (Best, 2006). Air dalam sel terdiri atas ***bulk water*** yang mengisi 90% dari sel serta ***bound water*** yang mengisi hanya 10% dari sel. *Bulk water* adalah air yang bisa membeku dan akan keluar akibat perubahan tekanan osmotik. Sedangkan *bound water* adalah molekul air yang 20-100 kali lebih kental dibandingkan dengan *bulk water*, yang ikatan hidrogennya terikat sangat erat pada permukaan yang bersifat hidrofilik dari makromolekul (protein, asam nukleat atau ujung polar dari kelompok *phospholipids*). Toksisitas gliserol akibat terjadi adanya ikatan OH gliserol pada hidrogen molekul air yang berlebihan, akibatnya terjadi perpindahan air keluar sel. Bukan hanya *bulk water* keluar tetapi juga mungkin perpindahan *bound water* yang seharusnya tetap berada di dalam sel.

Pada penelitian ini tanpa melihat individu pejantan, gliserol 5% menunjukkan kualitas terbaik dibandingkan dengan $G_{7,5}$ atau G_{10}. Penurunan kualitas pada saat pembekuan tertinggi pada terjadi pada G_{10}, diikuti oleh $G_{7,5}$ dan terakhir G_5. *Recovery rate* tertinggi pada G_5 disusul $G_{7,5}$ dan G_{10}.

SIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah semen beku kuda pada pengencer skim-glukosa dengan gliserol 5% memiliki kualitas terbaik dibandingkan dengan gliserol 7,5 atau 10%.

SARAN

Saran yang bisa diberikan adalah perlu dilakukan penelitian lanjut menggunakan gliserol dengan konsentrasi yang lebih rendah (di bawah 5%) serta perlu dilakukan inseminasi buatan untuk mengetahui fertilitas yang sebenarnya. Selain itu perlu dilakukan penelitian lanjut menggunakan krioprotektan lain agar kerusakan spermatozoa akibat toksisitas bisa dikurangi

DAFTAR PUSTAKA

[Anonim], 2002. Cryopreservatin and Storage of Cell Lines. www.sigmaaldrich.com/... / Cell_Culture/ Key_Resources /ECACC_

Handbook/Cell_Culture_Tecniques_7.html - 59k-

______. 2006. Cryopreservation of Equine Spermatozoa. www.pilchuckvet.com/ resources/ cryopreservation.pdf -

Alvarenga, M.A, Leão, K,M, Papa, F,O, Landim-Alvarenga, F.C., Medeiros, A.S.L., and Gomes, G.M. 2004. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of a Workshop on transporting Gametes and Embryos 2nd .Brewster, Massachusetts : R & W Publications.

Arifiantini, R.I dan Yusuf, T.L 2006. Keberhasilan Penggunaan Tiga Pengencer Dalam Dua Jenis Kemasan Pada Proses Pembekuan Semen Sapi Frisien Holstein. *Majalah Ilmiah Peternakan*. 9 (3) 89-93

Arifiantini RI, Yusuf TL, Purwantara B. 2006. Daya Tahan Spermatozoa Kuda Hasil Sentrifugasi dengan Kadar Plasma Semen yang Berbeda menggunakan Pengencer Skim. *J. Animal Production* 8 (3); 160-167

Barth AD, Oko RJ. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa: Iowa State University Press.

Best, B. 2006. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryonics. www. benbest.com/resources/cryopreservation.pdf (6 September 2006)

Correa JR, Rodriquez MC, Patterson DJ, Zavos PM. 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effection sperm viability, osmotic shock and sperm membrane integrity. *Theriogenology* 46 : 413-420

Dowsett KF, Knott LM. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46 : 397 – 412.

Fahy GM. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, 23 : 1-13.

Hafez ESE. 1993. Semen Evaluation. Dalam : Hafez ESE. 1993. *Reproduction in Farm Animals*. 6th Philadelphia. Ed Lea and Febiger.

Hafez ESE. 2000. Semen evaluation. *Dalam* Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction In Farm Animals*. 7th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.

Garner DL, Hafez ESE. 2000. Sperma-tozoa and seminal plasma. *Dalam* Hafez, B, Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction In Farm Animals*. 7th Ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.

Kacker RN. Panwar BS. 1995. *Text Book of Equine Husbandry*. 1st Ed. New Delhi. Vikas Publishing House PVT LTD.

Linfor J J, Pommer AC, Meyer SA. 2002. Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm. *Theriogenology* 58 : 355-358

Mazur P. 1980. Fundamental aspect of the freezing of cells with emphasis on mammalian ovarium embryos. 9th International congress on animal reproduction and artificial insemination Vol 1 :99-114.

Morel DMCG.1999. *Equine Artificial Insemination*. Oxon: CABI Publishing, Wallingford.

Nalley WM. 2006. Kajian Reproduksi dan Penerapan Teknologi Inseminasi Buatan Pada Rusa Timor [*Disertasi*]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

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]

Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ. 1990. Examination of methods for the deep freezing of goat semen. *Reprod Fertil Dev*. 2 :27-34.

Salisbury GW, Vandemark NL. 1984. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Penerjemah :Djanuar R. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

Sorensen, A.M. JR.1987. *Reprod Lab A. Laboratory Manual for Animal Reprod. Animal Science* Department Texas A and M University. 4th Ed. Massachusetts: American Press.

Squires E L, Keith S.L, Graham JK. 2004. Evaluation of Alternatif Cryoprotec-tans for Preserving Stallion. Spermatozoa. *Theriogenology* 62 :1056–1065

Tambing, S.N, 1999. Efektifitas Berbagai Dosis Gliserol di dalam Pengencer Tris dan Waktu Ekuilibrasi terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. *Tesis*. Bogor : Institut Pertanian Bogor

Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B, Magistrini M, Ecot P. 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and /or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58 : 249-251.

White I G. 1993. Lipids and Calcium Up take of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*, 5: 639-658

Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54 : 579-585.