Med. Pet. Vol. 32 No. 3: 155-228
Desember 2009

Media Peternakan

Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan
Journal of Animal Science and Technology

Terakreditasi B SK Dikti No. 43/DIKTI/Kep/2008

ARTIKEL :

Media Peternakan, Desember 2009, hlm. 171-178 Vol. 32 No. 3
ISSN 0126-0472
Terakreditasi B SK Dikti No: 43/DIKTI/Kep/2008

Peranan Fruktosa, Rafinosa, dan Trehalosa pada Kriopreservasi Semen Kuda

Effect of Fructose, Raffinose, and Trehalose on Stallion Semen Cryopreservation

R. I. Arifiantini*, B. Purwantara, T. L. Yusuf, & D. Sajuthi
Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor,
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
(Diterima 16-02-2009; disetujui 04-11-2009)

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effectiveness of carbohydrates supplementation on the stallion semen cryopreservation. Semen was collected from 3 stallions using artificial vagina twice a week. Collected semen was evaluated macro- and microscopically. Semen showed >60% progressive motility was then divided into 3 tubes and diluted with skim milk 1:1, centrifuged at 1006 g for 10 minutes. Supernatan was removed and each pellet rediluted either with skim milk extender supplemented with 50 mM trehalose (ST); 50 mM raffinose (SR) or 100 mM fructose (SF) with the concentration of sperm were 200×10^6 ml^{-1}. Extended semen packed into minitub 0.3 ml and equilibrates at 4 °C for 2 hours, freezes in the liquid nitrogen vapor for 10 minutes and stored in liquid nitrogen container -196 °C for further evaluation. After 24 hours, the semen was thawed at 37 °C for 30 second. The results of this experiment indicated that trehalose supplementation in skim milk was found to significantly improve the percentage of sperm motility ($P<0.05$) for stallion 1 and 3 compared to raffinose and fructose. But in all stallions, trehalose and fructose were superior compared to raffinose.

Key words: cryopreservation, stallion sperm, sugar

PENDAHULUAN

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). Proses pendinginan, pembekuan dan *thawing* akan menyebabkan perubahan suhu yang drastis sehingga akan menyebabkan kerusakan pada membran sel spermatozoa. Selain itu, spermatozoa juga akan mengalami perubahan tekanan osmotik saat dipaparkan pada bahan pengencer yang mengandung krioprotektan. Metabolisme spermatozoa ditekan sampai titik terendah pada saat pembekuan dan penyimpanan semen beku sehingga spermatozoa tidak

* Korespondensi:
Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
Ph. 0251-8629461, fax 0251-8629459
e-mail:iis_arifiantini@telkom.net

membutuhkan sumber nutrisi. Selama proses pengenceran, ekuilibrasi, *thawing* dan sebelum semen dideposisikan pada alat kelamin betina, spermatozoa akan membutuhkan sumber nutrisi untuk melakukan aktivitas fisiologisnya. Oleh karena itu pada pengencer semen beku dibutuhkan karbohidrat yang akan digunakan sebagai sumber energi spermatozoa.

Karbohidrat dapat berfungsi ganda. Karbohidrat sederhana seperti glukosa dan fruktosa dibutuhkan sebagai sumber energi, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Penggunaan disakarida (trehalosa), trisakarida (rafinosa), dan oligosakarida lainnya pada pengenceran semen beberapa ternak diduga lebih mampu melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan (Yildiz *et al.*, 2000). Trehalosa dan rafinosa adalah karbohidrat dengan molekul besar yang berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Rudolph & Crowe, 1985). Penggunaan trehalosa dan *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) pada pembuatan semen beku domba dilaporkan dapat meningkatkan persentase spermatozoa motil dibandingkan dengan hanya menggunakan fruktosa (Aisen *et al.*, 2000).

Rafinosa dilaporkan oleh Suwarso (1999) merupakan jenis karbohidrat yang baik digunakan untuk pembekuan semen kambing, karena selain berfungsi sebagai sumber energi juga berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Keunggulan penambahan trehalosa telah dilaporkan pada semen tikus (Sztein *et al.*, 2001), sapi (Woelders *et al.*, 1997), anjing (Yildiz *et al.*, 2000), domba (Aisen *et al.*, 2002), kambing (Suwarso, 1999; Aboagla & Terada, 2004) dan babi (Hu *et al.*, 2009). Penelitian penggunaan trehalosa pada semen kuda baru dilaporkan oleh Squires *et al.* (2004), tetapi menggunakan pengencer komersial semen kuda (EZ Mixin Basic Formula). Penelitian ini bertujuan menguji suplementasi berbagai macam gula yaitu trehalosa, rafinosa dan fruktosa dalam pengencer susu skim untuk pembekuan semen kuda.

MATERI DAN METODE

Sumber Semen

Tiga ekor kuda jantan yang digunakan sebagai sumber semen dalam penelitian ini milik Athena *stable,* Cinere-Depok, terdiri atas satu ekor generasi empat (G4) *thoroughbred* (Spirit of Jatim/jantan 1); satu ekor *american pinto* (Sony Boy/jantan 2) dan satu ekor *swedish warmblood* (Prince Couperos/jantan 3) berumur antara 5 dan 8 tahun hasil seleksi dengan kriteria sehat dan teruji, serta menunjukkan kualitas terbaik dari evaluasi produksi spermatozoa harian. Kuda-kuda tersebut dikandangkan secara individual diberi pakan berupa konsentrat dan *bran* masing-masing sebanyak 3 kg serta rumput yang telah dilayukan sebanyak 10 kg, air minum diberikan *ad libitum.*

Pengencer Semen

Penelitian dimulai dengan penyiapan bahan pengencer, yaitu: (1) 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). (2) Pengencer semen beku terdiri atas tiga macam, yaitu pengencer dasar skim untuk sentrifugasi disuplementasi masing-masing dengan trehalosa 50 mM (Sigma, Chemical Co. St. Louis, Mo, USA), raffinosa 50 mM (BDH Chemical Ltd. Poole, England) atau fruktosa 100 mM (Merck, KgaA, Darmstadt, Germany) (konsentrasi gula yang digunakan merupakan hasil terbaik dari uji pendahuluan pada semen cair), sebagai krioprotektan digunakan gliserol 5%.

Koleksi dan Pengolahan Semen

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan tipe Nishikawa (Jepang) dan dimodifikasi dengan tabung penampung semen tipe Missouri (Nasco, Fort Atkinson, WI). Kain kasa dipasang pada mulut botol penampung untuk menyaring bagian gel (Arifiantini *et al.*, 2006b). Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis yang meliputi: volume (ml), warna, konsistensi dan pH yang diukur menggunakan *pH special indicator paper* (Merck, interval 6-8 skala 0,2).

Evaluasi secara mikroskopis dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa motil (%SM); spermatozoa hidup (%SH), konsentrasi spermatozoa, dan morfologi spermatozoa normal. Penentukan persentase spermatozoa motil menggunakan metode subjektif kuantitatif dari 5 lapang dengan nilai 0% (tidak motil) sampai dengan 100% (motil seluruhnya). Persentase spermatozoa hidup menggunakan pewarnaan eosin nigrosin (Barth & Oko, 1989), spermatozoa hidup tidak akan menyerap warna dan spermatozoa yang mati akan menyerap warna eosin, dari 10 lapang pandang dengan jumlah total sel terhitung >200 sel. Konsentrasi spermatozoa per ml dihitung menggunakan *neubauer chamber* dengan pengenceran 100x dalam NaCl 3% (Parish's, 2003) dan morfologi (normalitas) dengan pewarnaan williams (Arifiantini *et al.*, 2006a). Mikroskop yang digunakan adalah Olympus CH 20. Semen dengan persentase motilitas >60% dan persentase spermatozoa yang abnormal <35% digunakan dalam penelitian ini.

Semen untuk kepentingan pengenceran dibagi ke dalam tiga tabung ditambah bahan pengencer skim 1:1 dan disentrifugasi menggunakan sentrifuse *portable* (Hettich EBA 3S. Tuttlingen. Jerman) dengan kecepatan 1006 x *g* selama 15 menit (Arifiantini *et al.*, 2006b). Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang dan *pellet* (spermatozoa) dilarutkan kembali, masing-masing dengan pengencer skim trehalosa, skim rafinosa dan skim fruktosa dengan konsentrasi spermatozoa 200×10^6 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 (Arifiantini *et al.*, 2007).

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 untuk pengamatan lebih lanjut. *Thawing* dilakukan pada air hangat (37 °C) selama 30 detik. Pengamatan persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup dilakukan pada semen segar, setelah pengenceran, ekuilibrasi, dan *thawing*. Keberhasilan pembekuan juga dinilai dari *recovery rate* (RR), yaitu jumlah spermatozoa yang berhasil pulih dari proses pembekuan yang dihitung menurut (Hafez, 1993) dengan rumus:

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

Data dianalisa menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial, diulang sebanyak empat kali. Jika perlakuan berpengaruh nyata, maka dilakukan uji duncan (Walpole, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Semen segar dari ketiga kuda yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas yang berbeda ($P<0,05$). Semen jantan 3, mempunyai motilitas yang paling baik dibandingkan dengan jantan 2 atau jantan 1, dan tidak ada perbedaan pada jumlah spermatozoa yang hidup. Tanpa melihat faktor individu secara keseluruhan semen segar mempunyai kualitas yang cukup baik dengan volume semen tanpa gel 27,8±6,2 ml, pH 7,0±0,1 berwarna putih keruh dengan konsistensi encer. Secara mikroskopis menunjukkan persentase spermatozoa motil rata-rata 67,8±4,2 dan spermatozoa hidup 78,8±4,0%. Konsentrasi spermatozoa adalah $219,6 \pm 9,2 \times 10^6$ ml^{-1} dengan spermatozoa normal mencapai 72,2±3,4% (Tabel 1).

Kualitas Semen Beku

Motilitas spermatozoa pada jantan 1, jantan 2, dan jantan 3 sampai dengan setelah ekuilibrasi, mempunyai kemiripan dengan semen segar. Jantan 3 mempunyai motilitas dan spermatozoa hidup paling tinggi dibandingkan dengan 2 kuda lainnya. Karbohidrat yang digunakan tidak mempengaruhi motilitas pada jantan 3, tetapi pada jantan 1 dan 2 terlihat bahwa fruktosa menunjukkan motilitas yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan trehalosa ataupun rafinosa (Tabel 1). Kualitas semen beku kuda pada pengencer skim yang disuplementasi dengan trehalosa, rafinosa dan fruktosa dengan gliserol 5% menunjukkan hasil yang sangat bervariasi, antar individu yang digunakan ataupun antar karbohidrat yang digunakan.

Berdasarkan individu kuda, pada jantan 1 dan 3 terlihat bahwa suplementasi trehalosa pada pengencer skim menunjukkan persentase motilitas setelah *thawing* yang lebih tinggi dibandingkan dengan rafinosa ataupun fruktosa (Tabel 1). Fruktosa dan trehalosa pada jantan 2 menunjukkan persentase motilitas setelah *thawing* yang sama, yaitu 27,2%. Perbedaan motilitas pada jantan 1 dan 3 dengan jantan 2 terhadap trehalosa dapat diartikan bahwa pengaruh individu kuda berperanan dalam hal ini. Secara keseluruhan tanpa melihat individu kuda yang digunakan, trehalosa dan fruktosa menunjukkan motilitas setelah *thawing* yang hampir sama, yaitu 26,3% dan 22,2%, lebih tinggi dari rafinosa yang hanya 20%. Penemuan ini memperkuat hasil penelitian sebelumnya bahwa trehalosa merupakan karbohidrat yang dapat melindungi spermatozoa pada saat pembekuan seperti yang dilaporkan sebelumnya oleh Sztein *et al.* (2001) pada semen tikus; Woelders *et al.* (1997) pada semen sapi; Yildiz *et al.* (2000) pada semen anjing; Aisen *et al.* (2000) pada semen domba; Aboagla & Terada (2004) pada semen kambing serta Hu *et al.*, (2009) pada semen anjing.

Tabel 1. Pengaruh suplementasi berbagai karbohidrat pada pengencer skim terhadap persentase spermatozoa motil pada kuda jantan

	Kuda jantan	Jenis karbohidrat		
		Trehalosa	Rafinosa	Fruktosa
Semen segar	1	$63,3\pm2,9^a$	$63,3\pm2,9^a$	$63,3\pm2,9^a$
	2	$68,3\pm2,9^b$	$68,3\pm2,9^b$	$68,3\pm2,9^b$
	3	$71,7\pm2,9^c$	$71,7\pm2,9^c$	$71,7\pm2,9^c$
	Rataan	$67,8\pm4,2$	$67,8\pm4,2$	$67,8\pm4,2$
Setelah ekuilibrasi	1	$40,0\pm0,0^a$	$40,0\pm0,0^a$	$45,0\pm0,0^b$
	2	$63,3\pm2,9^b$	$63,3\pm2,9^b$	$68,3\pm2,9^c$
	3	$70,0\pm0,0^c$	$70,0\pm0,0^c$	$70,0\pm0,0^c$
	Rataan	$57,8\pm15,8$	$57,8\pm15,8$	$61,1\pm14,0$
Setelah *thawing*	1	$25,0\pm5,0^b$	$17,8\pm4,4^a$	$20,0\pm4,3^a$
	2	$27,2\pm6,2^b$	$22,2\pm9,1^{ab}$	$27,2\pm3,6^b$
	3	$26,7\pm2,5^b$	$20,0\pm2,5^a$	$19,4\pm4,6^a$
	Rataan	$26,3\pm1,2$	$20,0\pm2,2$	$22,2\pm4,3$
Recovery rate	1	39,5	26,8	31,6
	2	39,8	32,5	39,8
	3	37,2	27,9	27,1
	Rataan	38,8	29,5	32,8

Keterangan: superskrip berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$); kuda jantan 1=Spirit of Jatim, generasi empat (G4) kuda *thoroughbred*; kuda jantan 2=Sony Boy, kuda *american pinto*; kuda jantan 3=Prince Couperos, kuda *swedish warmblood.*

Hasil penelitian ini berbeda dengan Squires *et al.* (2004) yang menyatakan bahwa rafinosa atau trehalosa pada pengencer skim tidak meningkatkan motilitas spermatozoa dengan nilai masing-masing adalah rafinosa 65%, trehalosa 66%, dan kontrol 63%.

Terdapat perbedaan yang cukup signifikan pada pengamatan spermatozoa yang hidup. Jantan 1 menunjukkan nilai yang paling baik pada trehalosa dan fruktosa dibandingkan dengan jantan 2 dan 3. Rataan dari ke-3 kuda yang digunakan ternyata trehalosa dan fruktosa menunjukkan nilai yang hampir sama, yaitu 44,29±8,77% dan 44,80±8,83% lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan rafinosa (39,78±2,.41%) (Tabel 2). Hal ini dapat diartikan bahwa jantan 1, meskipun mempunyai kualitas semen segar yang paling rendah tetapi motilitas atau pun persentase spermatozoa hidup setelah *thawing* menunjukkan nilai yang tidak berbeda dengan jantan 2 dan 3 yang mempunyai kualitas semen segar yang lebih baik. Hal ini terbukti dari nilai RR (spermatozoa-spermatozoa yang berhasil pulih kembali setelah dibekukan) pada masing masing jantan berbeda-beda untuk setiap karbohidrat yang digunakan. Nilai RR pada trehalosa menunjukkan nilai yang hampir sama pada ketiga jantan, sedangkan pada fruktosa dan rafinosa hanya jantan 2 yang menunjukkan nilai yang konsisten. Tanpa melihat pengaruh individu kuda, nilai RR trehalosa menunjukkan nilai tertinggi, yaitu 38,79%, diikuti oleh fruktosa 32,79% dan paling rendah adalah rafinosa hanya 29,51%.

Menurut Vishwanath & Shannon (2000), karbohidrat mempunyai berbagai peranan pengencer semen, diantaranya untuk menstabilkan tekanan osmotik dan sebagai krioprotektan. Seperti telah dilaporkan oleh Yildiz *et al.* (2000) dan Aisen *et al.* (2000), trehalosa dapat meningkatkan kualitas setelah *thawing* pada semen anjing dan domba, yang dalam penelitian ini juga terbukti dapat menghasilkan motilitas spermatozoa setelah *thawing* yang lebih baik dibandingkan dengan karbohidrat lainnya. Kerja trehalosa sebagai krioprotektan ekstraseluler bersama-sama dengan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler pada semen kuda dapat melindungi spermatozoa dengan baik. Rafinosa yang dilaporkan oleh Rudolph

Tabel 2. Pengaruh suplementasi berbagai karbohidrat pada pengencer skim terhadap persentase spermatozoa hidup pada kuda jantan

Tahapan	Kuda jantan	Jenis karbohidrat		
		Trehalosa	Rafinosa	Fruktosa
Semen segar	1	79,9±2,7[a]	79,9±2,7[a]	79,9±2,7[a]
	2	77,9±3,0[a]	77,9±3,0[a]	77,9±3,0[a]
	3	78,7±6,6[a]	78,7±6,6[a]	78,7±6,6[a]
	Rataan	78,8±1,0	78,8±1,0	78,8±1,0
Setelah ekuilibrasi	1	66,2±0,9[a]	67,0±1,5[a]	75,1±1,0[b]
	2	74,9±1,4[b]	74,0±3,4[bc]	76,3±1,0[b]
	3	75,5±1,0[b]	77,8±0,9[c]	74,7±1,0[b]
	Rataan	72,2±5,2	72,9±5,5	75,3±0,8
Setelah *thawing*	1	52,4±12,8[c]	37,78±10,7[ab]	54,3±4,4[c]
	2	34,9±5,9[a]	39,09±7,7[ab]	43,3±9,7[b]
	3	45,5±6,6[c]	42,47±5,7[abc]	36,8±10,7[b]
	Rataan	44,3±8,8	39,8±2,4	44,8±8,8

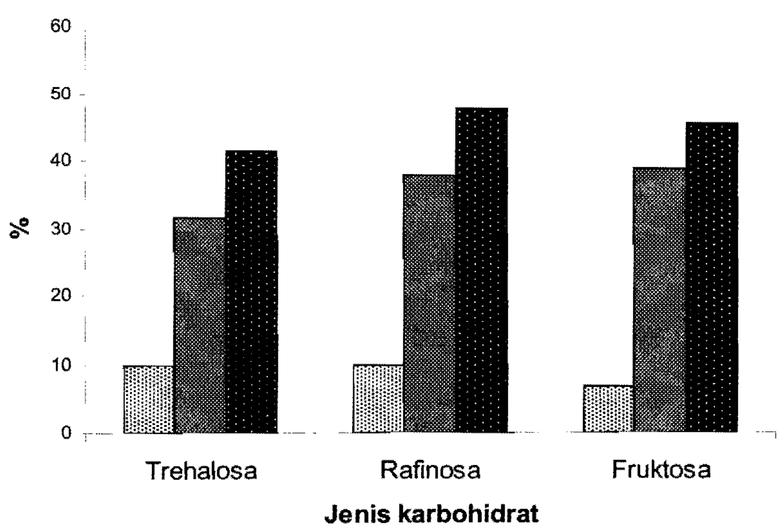
Keterangan: superskrip berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$); kuda jantan 1=Spirit of Jatim, generasi empat (G4) kuda *thoroughbred*; kuda jantan 2=Sony Boy, kuda *american pinto*; kuda jantan 3=Prince Couperos, kuda *swedish warmblood*.

& Crowe (1985) dapat berperan sama dengan trehalosa, dalam penelitian ini tidak terbukti. Penggunaan trehalosa pada pembekuan semen kuda belum banyak dilaporkan. Keunggulan trehalosa pada pembekuan semen domba telah dilaporkan oleh Aisen *et al.* (2000), dan pada semen kambing penggunaan trehalosa dapat meningkatkan fluiditas (kelenturan) dari membran plasma sehingga melindungi pada saat pembekuan (Aboagla & Terada, 2003).

Menurut 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*. Saat terjadi proses pembekuan, bagian luar sel akan mengalami pembekuan terlebih dahulu, yang akan menarik air keluar dari dalam sel ke luar. Trehalosa yang merupakan jenis karbohidrat yang tidak toksik dan bersifat krioprotektan ini akan melindungi membran sel dengan cara mengikat air ke protein dan ke ujung polar dari *phospholipid* lebih kuat dibandingkan dengan *bound water* (Rudolph *et al.*, 1986).

Secara umum dibandingkan dengan proses pembekuan semen ternak lain, penurunan kualitas yang terjadi pada semen kuda ini sangat tinggi. Penurunan persentase motilitas spermatozoa, dari semen segar ke setelah ekuilibrasi masih rendah hanya berkisar antara 6,7% dan 10%. Penurunan yang terjadi setelah ekuilibrasi ke setelah *thawing* sangat tinggi, yaitu skim fruktosa sebesar 38,9%, skim rafinosa 37,8% dan skim trehalosa 31,5%. Total penurunan persentase spermatozoa motil dari semen segar ke setelah *thawing*, adalah 41,5% (skim trehalosa); 45,6% (skim fruktosa); dan skim rafinosa (47,8) (Gambar 1).

Spermatozoa mengalami berbagai kerusakan selama proses pembekuan semen, yang dipengaruhi oleh perubahan suhu dan tekanan osmotik (Baumber *et al.*, 2003) yang akan secara langsung mempengaruhi membran plasma. Neild *et al.* (2003) melaporkan kerusakan membran plasma kuda terjadi pada saat sentrifugasi, pengenceran kembali setelah sentrifugasi, equilibrasi pada suhu ruang ataupun setelah pendinginan pada suhu 5°C. Kerusakan lain yang terjadi pada pembekuan semen adalah terjadinya peroksidasi lipida (Baumber *et al.*, 2003; Bailey *et al.*, 2000). Aktivitas peroksi-



Gambar 1. Penurunan persentase spermatozoa motil dari semen segar ke setelah equilibrasi (=SS-SE); dari setelah equilibrasi ke setelah *thawing* (=SE-ST) dan dari semen segar ke setelah *thawing* (=SS-ST) pada pengencer skim yang disuplementasi dengan berbagai karbohidrat.

dasi lipida pada semen segar sangat rendah, tetapi setelah proses pembekuan menunjukkan adanya aktivitas peroksidasi lipida yang tinggi, tepatnya pada bagian *midpiece* (Gadella *et al.*, 2002). Hal ini menunjukkan bahwa peroksidasi lipida pada spermatozoa yang disebabkan oleh pembekuan terjadi pada bagian mitokhondria. Peroksidasi lipida diawali dengan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) sebagai produk sampingan dari metabolisme spermatozoa. Keberadaan ROS akan menyerang substrat yang terdekat, yaitu ikatan rangkap rantai asam lemak tidak jenuh yang terdapat pada bagian *midpiece*. Pengaruhnya secara langsung masih dalam penelitian, tetapi kelihatannya berhubungan dengan proses kapasitasi sehingga spermatozoa kehilangan fertilitasnya (Gadella, 2008).

Motilitas setelah *thawing* semen kuda berdasarkan persentase dibagi dalam tiga kategori, yaitu *bad freezer* (<20%), *regular* atau *moderate freezer* (20%-40%), dan *good freezer* (>40%) (Alvarenga *et al.*, 2005). Ketiga kuda jantan yang digunakan dalam penelitian ini dapat digolongkan ke *regular freezer* karena hanya menghasilkan persentase motilitas setelah *thawing* antara 20% dan 40%. Standar nasional untuk motilitas setelah *thawing* (post thawing motility=PTM) pada semen beku sapi agar semen tersebut layak diinseminasikan adalah lebih dari 40%. Motilitas pada kuda yang diperhitungkan adalah jumlah total spermatozoa yang motil (total number motile sperm). Satu kali inseminasi membutuhkan minimal 300×10^6 sel, sehingga berapapun PTM yang dihasilkan, semen beku tersebut akan disimpan dan dimanfaatkan. Jumlah *straw* yang diinseminasikan akan berbeda bergantung pada nilai PTM. Semakin tinggi PTM, semakin sedikit jumlah *straw* yang digunakan, dan semakin rendah PTM, maka jumlah *straw* yang diinseminasikan semakin banyak agar tercapai angka konsepsi yang diharapkan.

KESIMPULAN

Penambahan trehalosa 50 mM dalam pengencer skim dapat meningkatkan kualitas semen beku kuda. Perlu dilakukan inseminasi menggunakan semen beku yang dihasilkan untuk mengetahui fertilitas semen beku yang sesungguhnya.

DAFTAR PUSTAKA

Aboagla, E.M-E & T. Terada. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. Biol. of Reprod. 69: 1245–1250

Aboagla, E.M-E & T. Terada. 2004. Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. Theriogenology 62: 809-818.

Aisen, E. G., H. L. Alvarez, A. Venturino, & J. J. Garde. 2000. Effect trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology 53: 1053-1061.

Alvarenga, M. A., K.nM., Leão, F. O. Papa, F. C. Landim-Alvarenga, A. S. L. Medeiros, & G. M. Gomes. 2004. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos 2nd. October, 5th 2003.

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

Arifiantini, I. T. Wresdiyati, & E. F. Retnani. 2006a. Morfologi spermatozoa sapi bali (*Bos sondaicus*) menggunakan pewarnaan "Williams". Jurnal Pengembangan Peternakan Tropis 31: 105-110.

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

Arifiantini, R. I., I. Supriatna, & Samsulrizal. 2007. Penentuan waktu ekuilibrasi pada pembekuan semen kuda menggunakan bahan pengecer susu skim. Animal Production. Jurnal Produksi Ternak 9: 145-152.

Bailey, J. L., J. F. Bilodeau, & N. Cormier. 2000. Semen cryopreservation in Domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J. of Androl 21: 1-6.

Barth, A. D. & R. J. Oko. 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press, Iowa.

Baumber, J., B. A. Ball, J. J. Linfor, & S. A. Meyers. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. J. Androl. 24: 621-628

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

Gadella, B. M., R. Rathi, M. M. Bevers, J. F. H. M. Brouwers, D. Neild, & B. Colenbrander. 2002. The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function. Proceedings of the Second Meeting of the European Equine Gamete Group (EEGG). 26th–29th September 2001. Loosdrecht. R &W Publications.

Gadella, B. M. 2008. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. Anim. Reprod. Sci. 107: 229-236.

Hafez, E. S. E. 1993. Semen Evaluation. In: Hafez, E.S.E. Reproduction in Farm Animals (Eds) 6thEd. Lea and Febiger. Philadelphia

Hu, J. H, Q-W. Li, G. Li, Z. L. Jiang, S. H. Bu, H. Yang, & L. Q. Wang. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. Anim. Reprod. Sci. 112: 107-118.

Kenney, R. M., 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.

Linfor, J. J., A. C. Pommer, & S. A. Meyers. 2002. Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm. Theriogenology 58: 355-358.

Neild, D. M, B. M. Gadella, M. G. Chaves, M. H. Miragaya, B. Colenbrander, & A. Agüero. 2003. Membrane changes during different stages of a free-thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology 59: 1693-1705.

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 & J. W. Crowe. 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and praline. Cryobiology 22: 367-377

Rudolph, A.S, J. H. Crowe, & L.M. Crowe. 1986. Effects of three stabilizing agents-proline, betaine and trehalose-on membrane phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 254: 134-143.

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

Sztein, J. M, K. Noble, J. S. Farley, & L. E .Mobraaten. 2001. Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology 42: 28–39.

Suwarso. 1999. Peranan raffinosa dalam pengencer tris-sitrat kuning telur terhadap semen beku kambing Peranakan Etawah. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Vishwanath, R. & P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62: 23-53.

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. Edisi ke 3. Terjemahan. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Woelders, H., A. Matthij, & B. Engel. 1997. Effects of trehalose and sucrose osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology 35: 93-105.

Yildiz, C., A. Kaya, M. Aksoy, & 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.