Media Peternakan, Desember 2007, hlm. 163-172 Vol. 30 No. 3
ISSN 0126-0472
Terakreditasi SK Dikti No: 56/DIKTI/Kep/2005

Karakteristik Semen Segar dan Kualitas Semen Cair Kuda dalam Pengencer Dimitropoulos yang Disuplementasi dengan Fruktosa, Trehalosa dan Rafinosa

Yudi, I. Arifiantini, B. Purwantara & T.L. Yusuf
Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Gedung FKH-IPB Wing 3 Lantai 3, Jl. Agathis Kampus IPB Darmaga, email: yudi_r@ipb.ac.id
(Diterima 27-02-2007; disetujui 13-05-2007)

ABSTRACT

The objective of the experiment was to study the characteristics of stallion fresh semen and the quality of sperm preserved in Dimitropoulos extender (DV) supplemented with different concentration of fructose, trehalose and raffinose. Semen were collected using artificial vagina from three stallions. Semen characteristics and quality were evaluated macro- and microscopically. Prior to extension, semen were centrifugated at 3000 rpm for 20 minutes. The condensed sperm were re-suspended in DV supplemented with different types of carbohydrate to meet the concentration of 200 million spz/ml. All samples were stored at room and chilled temperature, and were evaluated for motility and viability every 3 h and 12 h. The results of the experiments indicated that fresh semen characteristics were fair good; the volume, consistency, motility, live-dead ratio, concentration (10^6/ml), total spermatozoa (10^9/ejaculate) and abnormality were 29.25±9.33 ml, watery, 7.00±0.12, 67.08±9.08%, 77.89±6.46%, 211.88±21.15, 6.28±2.45 and 27.26±4.64%, respectively. The supplementation of different type and concentration of carbohydrates did not significantly affect the motility and viability. However, the supplementation of 50 mM fructose significantly increased the motility and viability of the sperm compared to the control. In conclusion, carbohydrate supplementation in DV may not maintain the sperm quality, particularly in the medium with the osmolarity higher than 400 mOsm/kg.

Key words: stallion, semen, Dimitropoulos, carbohydrate

PENDAHULUAN

Perkembangan peternakan kuda di Indonesia belum mendapat perhatian serius dari pemerintah dan masyarakat. Populasi kuda, terutama kuda lokal terus menurun. Hal ini disebabkan oleh perkembangbiakannya masih mengandalkan perkawinan secara kawin alam sehingga berbagai kendala mengakibatkan angka kelahiran dan kematian tidak seimbang. Populasi kuda mencapai 582.300 ekor pada tahun 1997, sedangkan tahun 2003 sekitar 452.900 ekor (Ditjennak Deptan & Asohi, 1999; BPS, 2003). Rata-rata penurunan populasi kuda di Indonesia dari tahun 1997 sampai dengan 2003 adalah sekitar 22,20% (3,7% per tahun). Penurunan tersebut diduga terkait dengan tingginya angka pemotongan yang didorong oleh kesulitan ekonomi peternak, pengafkiran oleh berbagai sebab, dan rendahnya angka kelahiran.

Usaha meningkatkan populasi kuda di Indonesia perlu terus dilakukan, diantaranya dengan penerapan teknologi inseminasi buatan (IB). Saat ini, IB pada kuda telah dilakukan secara terbatas menggunakan semen beku impor. Adanya Balai IB, lembaga penelitian peternakan dan perguruan tinggi, potensi kuda lokal dapat lebih dikembangkan melalui IB. Pelaksanaannya dapat dilakukan dengan semen cair produksi dalam negeri. IB dengan semen cair terbukti menghasilkan fertilitas lebih tinggi (Morel, 1999) dan lebih murah daripada semen beku.

Oleh karena keberhasilan IB memerlukan semen yang berkualitas baik, maka proses pengolahannya perlu perhatian serius karena karakteristik semen kuda agak berbeda dengan ternak lain. Semen kuda terdiri atas tiga fraksi, yaitu fraksi pra-spermatozoa, fraksi kaya-spermatozoa dan fraksi pasca-spermatozoa, dengan volume banyak dan konsentrasi rendah. Sebagai sumber energi dalam media preservasi semen kuda biasanya digunakan glukosa, berbeda dengan ternak lain yaitu fruktosa (Toelihere, 1993). Namun demikian, penambahan disakarida dan oligosakarida mampu mempertahankan kualitas semen cair dan beku pada beberapa ternak (Yildiz *et al.,* 2000). Pemilihan karbohidrat sebagai sumber energi sekaligus pelindung spermatozoa (*anti-cold shock*) penting karena karbohidrat yang sesuai akan meningkatkan daya simpannya. Hal ini disebabkan oleh metabolisme spermatozoa selama penyimpanan sangat mempengaruhi daya tahannya (Toelihere, 1993).

Penelitian ini mempelajari penggunaan bahan pengencer yang sudah banyak digunakan di Eropa yaitu Dimitropoulos (Ijaz & Ducharme, 1995) yang disuplementasi dengan beberapa karbohidrat yaitu fruktosa, trehalosa dan rafinosa. Daya tahan spermatozoa diuji dengan dilakukan penyimpanan pada suhu ruang dan lemari es (3-5^{o}C).

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Athena Stable Sawangan-Depok dan Bagian Reproduksi dan Kebidanan FKH-IPB. Semen dikoleksi dari 3 ekor kuda jantan, berumur 4-8 tahun, bobot badan 500-650 kg dan sehat secara klinik. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap, dengan 12 ulangan (individu sebagai ulangan). Data dianalisa dengan ANOVA (program SAS) dan uji Duncan.

Penampungan Semen

Ejakulat (semen segar) dikoleksi dengan vagina buatan tipe Nishikawa yang dikombinasikan dengan tabung penampung tipe Missouri, dua kali per minggu. Sebagai pemancing digunakan kuda betina dewasa yang sudah diinjeksi estradiol sehingga menampakkan perilaku berahi. Pemisahan fraksi gel (pasca-spermatozoa) dilakukan dengan memasang kain kasa beberapa lapis pada mulut tabung koleksi sebagai saringan, sehingga fraksi gel akan tertahan pada bagian luar kasa sedangkan fraksi kaya-spermatozoa tertampung di dalam tabung.

Evaluasi Semen Segar

Ejakulat dari seluruh kuda jantan dievaluasi untuk mengetahui karakteristiknya secara makroskopik dan mikroskopik. Secara makroskopik semen dievaluasi volume (tanpa gel), warna, konsistensi dan derajat keasaman (pH), sedangkan secara mikroskopik dievaluasi persentase spermatozoa motil progresif (%M), persentase spermatozoa hidup (%H), konsentrasi dan spermatozoa total, dan abnormalitas (%Abn).

Evaluasi makroskopik. Volume dan warna semen diketahui langsung segera setelah penampungan karena tabung penampung mempunyai skala dan berwarna transparan. Konsistensi semen diketahui dengan memiringkan secara perlahan semen di dalam tabung penampung dan mengembalikan ke posisi semula sehingga diketahui kecepatan cairan kembali ke posisi semula. Derajat keasaman (pH) diukur dengan meneteskan semen pada kertas indikator pH (skala

6,4-8,0), sehingga perubahan warna pada kertas dapat dibandingkan dengan warna standar.

Evaluasi mikroskopik. *Persentase spermatozoa motil progresif (%M).* Sampel semen dan NaCl fisiologis diteteskan pada permukaan gelas objek (sekitar 1:3). Selanjutnya diaduk perlahan, ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 10x40. Penilaian %M didasarkan pada persentase spermatozoa yang bergerak ke depan pada beberapa lapang pandang.

Persentase spermatozoa hidup (%H). Evaluasi dilakukan dengan pewarnaan diferensial eosin-negrosin 2%. Sampel semen dan zat pewarna (sekitar 1:3) dicampur pada gelas objek, dan dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek yang lain. Preparat selanjutnya difiksasi (dikeringkan) menggunakan *hair dryer*. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran 10x40. Spermatozoa hidup ditandai dengan bagian kepala berwarna terang, sedangkan yang mati dengan bagian kepala berwarna merah-ungu (eosinofilik).

Konsentrasi spermatozoa dan *spermatozoa total*. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *Neubauer chamber*. Sebelumnya sampel diencerkan 100 kali (10 µL semen + 990 µL NaCl 3%) dan dihomogenkan. Selanjutnya, sampel diisikan ke dalam kamar hitung pada *Neubauer chamber* yang telah ditutup gelas penutup. Penghitungan spermatozoa dilakukan pada 5 kotak besar yang terletak diagonal. Konsentrasi spermatozoa yang didapatkan adalah Y x 5 x 10^6 sel/mL (Y = jumlah spermatozoa pada 5 kotak). Total spermatozoa dalam satu ejakulat dihitung dengan mengalikan volume dengan konsentrasinya.

Abnormalitas (%Abn). Morfologi spermatozoa dievaluasi menggunakan pewarna diferensial eosin-negrosin 2%. Spermatozoa dinilai secara morfologi normal atau tidak, pada bagian kepala (abnormalitas primer), leher dan ekor (abnormalitas sekunder). Spermatozoa yang diamati minimal sebanyak 200 sel atau 10 lapang pandang menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 10x40.

Pembuatan Semen Cair

Semen dikoleksi, dievaluasi dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Selanjutnya pelet dilarutkan dalam pengencer Dimitropolous (DV) (Ijaz & Ducharme, 1995) sesuai dengan perlakukan sampai konsentrasi 200 juta sel/ml. Komposisi dasar Dimitropoulos setiap 100 ml mengandung glukosa 2,00 g, fruktosa 2,00 g, glisin 0,94 g, Na sitrat 2,00 g, kuning telur 20 ml, penisilin 50.000 IU/ml, sterptomisin 50 mg dan aquades ad 100 ml. Sebagai perlakuan ditambahkan berbagai konsentrasi fruktosa (F), trehalosa (T) dan rafinosa (R), masing-masing 50 mM, 100 mM dan 150 mM sebagai perlakuan: D0 (DV tanpa suplementasi, sebagai kontrol), F50, F100, F150, T50, T100, T150, R50, R100, dan R150. Osmolaritas masing-masing perlakuan adalah 293, 349, 409, 461, 352, 410, 472, 354, 414 dan 479 mOsm/kg, dengan pH semua perlakuan 6,7. Semen selanjutnya disimpan pada suhu ruang (26-29^{o}C) dan lemari es (3-5^{o}C) dalam tabung-tabung tertutup. Semen setelah diencerkan segera dimasukkan ke dalam tabung dan disimpan dalam *cooler box* yang sudah diatur suhunya selama transportasi. Segera setelah sampai di laboratorium semen cair dipindahkan ke dalam lemari es. Evaluasi %M dan %H dilakukan setiap 3 dan 12 jam untuk suhu ruang dan lemari es, masing-masing sampai dengan 24 dan 96 jam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Seluruh pejantan pada penelitian ini menghasilkan semen segar dengan kualitas cukup baik (Tabel 1). Data tersebut secara umum berada dalam selang normal, sehingga semua semen segar layak diproses menjadi semen cair.

Volume. Secara rataan volume semen yang didapat adalah 29,25±9,33 ml. Hasil ini tidak berbeda dengan Morel (1999) yang menyebutkan

Tabel 1. Karakteristik sifat fisik semen segar kuda

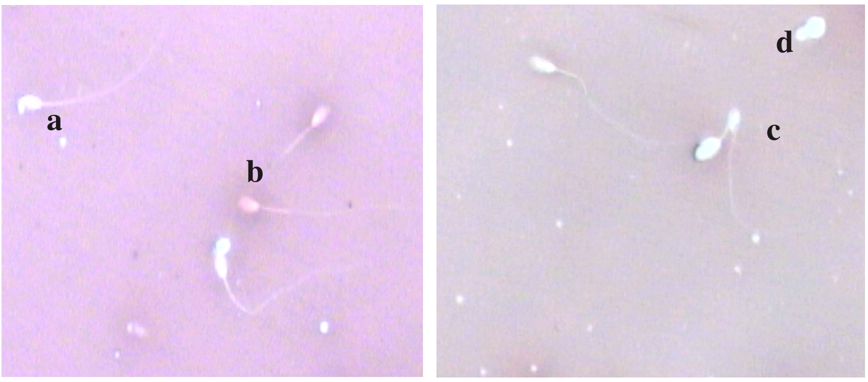
Karakteristik		Rataan	Kisaran
Makroskopik	Volume (ml)	29,25±9,33	15-55
	Warna	putih keruh	-
	Konsistensi	encer	-
	pH	7,00±0,12	6,70-7,20
Mikroskopik	Motilitas (%)	67,08±9,08	35-75
	Hidup (%)	77,89±6,46	52,20-82,70
	Konsentrasi (10^6/ml)	211,88±21,15	180-265
	Total spermatozoa (109)/ ejakulat	6,28±2,45	2,93-12,93
	Abnormalitas (%) :	27,26±4,64	19,23-37,49
	Primer	6,21±1,18	2,02-14,57
	Sekunder	21,02±2,58	13,43-33,97

volume semen dari *Thoroughbred, Standarbred* dan *Quarterhorse* adalah 28,3; 30,2 dan 23,8 ml. Jumlah tersebut lebih rendah dari Toelihere (1993) yaitu sebesar 70 ml (berkisar 30–250 ml). Beberapa faktor yang mempengaruhi volume adalah umur, musim, bangsa, frekuensi ejakulasi, *teasing* dan kesehatan (Morel, 1999).

Derajat keasaman, warna dan konsistensi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh semen mempunyai pH relatif netral, dengan rataan 7,00±0,12. Hasil ini tidak berbeda dengan Morel (1999) yang menyatakan bahwa pH semen kuda adalah 6,20–7,80. Secara umum warna semen yang didapatkan adalah putih-susu, dengan konsistensi encer. Menurut Hafez & Hafez (2000) konsistensi semen tergantung dari fraksi yang ditampung, fraksi pra-spermatozoa encer (watery), kaya-spermatozoa seperti susu tidak kental (milky, nonviscous), dan pasca-spermatozoa sangat kental (highly viscous). Warna dan konsistensi dipengaruhi oleh adanya urin pada semen (urospermia), adanya darah (hemospermia), adanya nanah (pyospermia), dan konsentrasi spermatozoa (Morel, 1999).

Persentase motil progresif (%M) dan persentase hidup (%H). Rataan %M yang didapat adalah 67,08±9,08%, sedangkan %H yang didapat adalah 77,89±6,46%. Hasil ini relatif sama dengan Toelihere (1993) yang mendapatkan motilitas sebesar 65%, serta Hafez & Hafez (2000) sebesar 40%-75%. Brinsko *et al.* (2000b) mendapatkan %M dan %H masing-masing sebesar 50% dan 55%. Persentase motilitas dapat dikategorikan menjadi *excellent* (≥70), *good* (55-69), *fair* (40-54) dan *poor* (<40) (Brinsko *et al.*, 2000b). Beberapa faktor yang mempengaruhi %M spermatozoa adalah suhu lingkungan, residu perlengkapan koleksi, pH dan osmolaritas media, dan interval koleksi (Rauge, 2003). Disarankan %M dan %H pada program IB, sebaiknya adalah lebih dari 60% (Morel, 1999; Rauge, 2003).

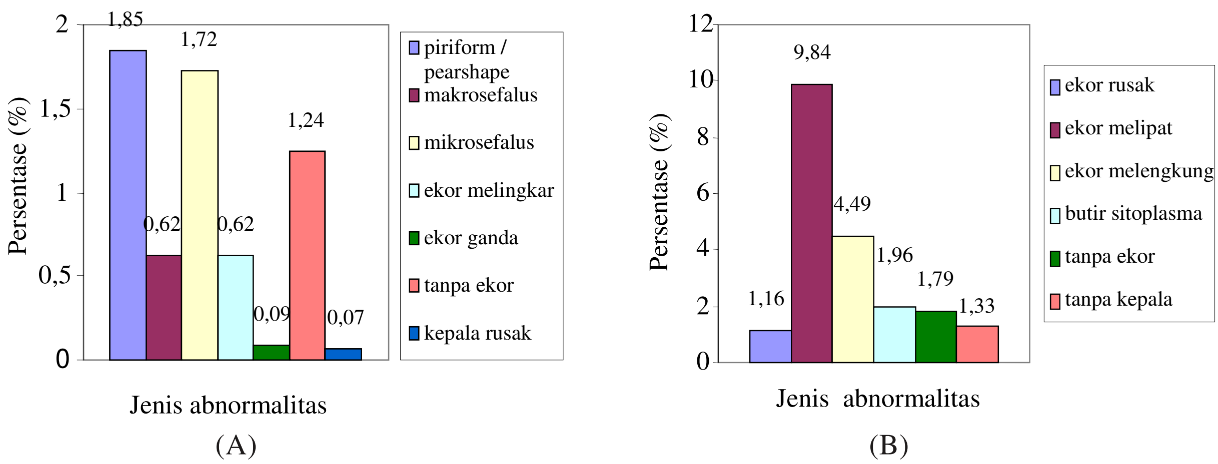
Konsentrasi dan spermatozoa total. Rataan konsentrasi dan spermatozoa total adalah (211,88±21,15) x 10^6/ml dan (6,28 ±2,45) x 10^9 per ejakulat. Konsentrasi yang didapat relatif sama dengan Hafez & Hafez (2000) sebesar (150-300) x 10^6/ml, tetapi relatif lebih tinggi dari Morel (1999) sebesar 114,29 x 10^6/ml, 97,24 x 10^6/ml, dan 171,66 x 10^6/ml masing-masing pada *Thoroughbred, Standardbred* dan *Quarterhorse*. Jumlah spermatozoa total yang dihasilkan relatif lebih tinggi dari Morel (1999) sebesar 5,03 x 10^9, 4,74 x 10^9, dan 5,37 x 10^9 pada *Thoroughbred, Standard-*



Gambar 1. Gambar spermatozoa hidup (a), spermatozoa mati (b), ekor melipat (c), dan kepala tanpa ekor (d). Pewarna : eosin-nigrosin 2%.

bred dan *Quarterhorse*, tetapi lebih rendah dari Toelihere (1993) sebesar 8,40 x 10^9.

Persentase abnormalitas (%Abn). Rataan %Abn yang didapat adalah 27,26±4,64% (morfologi normal sekitar 73%). Hasil ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan Sieme *et al.* (2004) yang mendapatkan %Abn sebesar 21,1±3,7%. Walaupun demikian, presentase morfologi normal sekitar 73% termasuk pada kisaran normal yaitu 60-90% (Hafez & Hafez, 2000). Dengan abnormalitas primer dan sekunder sebesar 6,21±1,18% dan 21,02±2,58%, menandakan spermatogenesis berlangsung baik. Berdasarkan jenisnya, abnormalitas primer yang banyak ditemukan adalah kepala *piriform/pearshape, microcephalus* dan kepala tanpa ekor, masing-masing 1,85%, 1,72% dan 1,24%. Abnormalitas sekunder yang paling banyak ditemukan adalah ekor melipat dan ekor melengkung, yaitu 9,84% dan 4,49% (Gambar 1 dan Gambar 2). Abnormalitas primer merupakan ketidaknormalan morfologi yang terjadi selama proses spematogenesis, sedangkan abnormalitas sekunder merupakan ketidak-normalan morfologi yang terjadi selama spermatozoa melewati saluran



Gambar 2. Jenis dan persentase abnormalitas primer (A) dan sekunder (B)

reproduksi atau karena perlakuan setelah diejakulasikan. Berdasarkan kriteria tersebut, abnormalitas primer lebih berbahaya karena sebagian bersifat genetik (Rauge, 2003).

Daya Tahan Semen Cair

Semua perlakuan pada semen cair menunjukkan pola penurunan %M dan %H yang hampir sama, baik penyimpanan pada suhu ruang maupun lemari es (Tabel 2 dan 3). Perbedaan %M secara nyata (P<0,05) diantara perlakuan dapat teramati setelah 3 jam pada suhu ruang. R150 (osmolaritas : 479 mOsm/kg) nyata lebih rendah dibanding kontrol (DV0; osmolaritas : 293 mOsm/kg). Berdasarkan %H setelah 21 jam, dimana F50 (osmolaritas : 349 mOsm/kg) nyata lebih tinggi dibanding kontrol. Perbedaan %M yang nyata (P<0,05) di antara perlakuan terlihat setelah 12 jam penyimpanan pada suhu lemari es, sedangkan berdasarkan %H setelah 72 jam. Perlakuan R150 memperlihatkan %M dan %H nyata lebih rendah daripada kontrol. Nilai %M yang nyata lebih tinggi daripada kontrol hanya terlihat pada perlakuan F50 setelah sampel disimpan selama 72 jam. Secara umum, perlakuan F50 cenderung mempunyai %M dan %H lebih tinggi, sedangkan T150 (osmolaritas : 472 mOsm/kg) dan R150 cenderung lebih rendah dari perlakuan lain, walaupun pada beberapa pengamatan tidak berbeda nyata.

Penyimpanan semen cair pada suhu ruang menyebabkan spermatozoa cepat kehilangan sumber energi, penurunan pH media oleh asam laktat sebagai sisa metabolisme, perubahan penuaan dan pertumbuhan kuman (Toelihere, 1993). Sementara itu, penyimpanan pada suhu dingin dapat menekan metabolisme sehingga dapat menghemat sumber energi, tetapi spermatozoa rentan terhadap efek *cold shock* (Brinsko *et al.,* 2000a). Efek *cold shock* terhadap spermatozoa kuda terjadi apabila semen disimpan pada suhu di bawah 20^{o}C (Kayser *et al.,* 1992). Oleh karena itu, perlu proses pendinginan secara perlahan dari 20^{o}C sampai dengan 5^{o}C. Penyimpanan semen cair kuda pada suhu rendah yang terbaik adalah pada suhu 4-6^{o}C (Moran *et al.,* 1992).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi fruktosa, trehalosa dan rafinosa menyebabkan media menjadi hipertonik sulit ditoleransi oleh spermatozoa. Menurut Morel (1999) osmolaritas media yang dapat ditoleransi oleh spermatozoa kuda adalah sebesar 250-400 mOsm/kg. Pommer *et al.* (2002) menyatakan bahwa osmolaritas media untuk semen cair sebesar 75, 150, 600 dan 900 mOsm/kg menghasilkan %M nyata lebih rendah (P<0,05), sedangkan 450 mOsm/kg menghasilkan %M dan %H tidak berbeda nyata terhadap kontrol (300 mOsm/kg). Media hipertonik menyebabkan sel berkerut karena cairan intraseluler merembes ke luar sel, sedangkan media hipotonik menyebabkan sel mengembang karena cairan ekstraseluler masuk ke dalam sel. Namun demikian, penggembungan sel lebih berefek negatif setidaknya berdasarkan parameter %M, %H dan potensial membran mitokondria (Pommer *et al*., 2002). Hal ini disebabkan oleh spermatozoa lebih mampu memelihara keseimbangan elektrolit dan potensial membran pada saat pengerutan daripada saat penggembungan.

Selain stres tekanan osmotik, daya tahan spermatozoa juga ditentukan oleh efek *cold shock* (White, 1993; Devireddy *et al.,* 2002). Stres osmotik (hipertonik) berpengaruh pada motilitas spermatozoa terkait dengan fase transisi fosfolipida yang menyebabkan penurunan fluiditas membran, sedangkan efek *cold shock* menyebabkan permeabilitas selektif membran rusak sehingga ion/senyawa tertentu mudah masuk ke dalam sel dan menyebabkan kerusakan. Kerentanan terhadap efek *cold shock* berkaitan dengan komposisi asam lemak pada fosfolipida, dan kandungan kolesterol membran (White 1993). Semakin tinggi rasio asam lemak takjenuh terhadap asam lemak jenuh dan semakin rendah kandungan kolesterol maka spermatozoa lebih rentan terhadap efek suhu dingin. Kandungan asam lemak takjenuh yang tinggi dalam kondisi aerob juga rentan terhadap reaksi peroksidasi yang menghasilkan radikal bebas, Tabel 2. Rataan persentase motilitas dan presentase hidup semen cair perlakuan yang disimpan pada suhu ruang (26-29 ^{o}C) (%)

Perlakuan	Lama penyimpanan (jam)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Persentase motil progresif									
DV0	66,25±6,44	53,33±5,37^{ab}	44,58±7,82^{ab}	35,42±7,82^{ab}	27,50±8,39^{ab}	19,58±7,53^{abc}	12,08±6,89^{abc}	6,67±5,37^{ab}	3,33±3,89^{ab}
F50	66,25±6,44	54,58±4,98^{a}	47,50±9,65^{a}	38,33±11,93^{a}	30,83±11,04^{a}	25,00±9,29^{a}	17,92±8,91^{a}	12,08±8,38^{a}	5,42±6,20^{a}
F100	66,25±6,44	52,08±7,82^{ab}	43,75±9,78^{abc}	35,42±10,97^{ab}	28,33±9,85^{ab}	21,25±9,32^{abc}	14,17±8,48^{ab}	7,50±7,83^{ab}	2,92±4,98^{ab}
F150	66,25±6,44	49,58±8,11^{abc}	41,67±10,94^{abc}	33,75±12,27^{ab}	26,25±10,25^{ab}	18,75±9,08^{abcd}	12,50±7,83^{abc}	6,25±6,08^{b}	2,08±3,34^{ab}
T50	66,25±6,44	52,50±3,37^{ab}	45,00±7,07^{ab}	37,92±8,65^{a}	30,00±8,53^{a}	22,92±7,82^{ab}	14,58±7,22^{ab}	8,75±6,78^{ab}	3,75±4,83^{ab}
T100	66,25±6,44	49,58±6,20^{abc}	40,83±7,93^{abc}	30,83±9,00^{abc}	24,17±8,21^{abc}	17,92±8,65^{abcd}	10,00±6,39^{bc}	5,00±65,64^{b}	2,08±2,58^{ab}
T150	66,25±6,44	46,25±7,72^{cd}	36,25±9,32^{cd}	26,67±10,08^{bc}	20,42±8,65^{bc}	14,17±8,75^{cd}	6,67±6,85^{c}	3,75±5,28^{b}	1,25±2,26^{b}
R50	66,25±6,44	52,92±4,98^{ab}	43,33±7,11^{abc}	36,25±8,56^{a}	28,75±8,56^{a}	20,42±7,53^{abc}	14,58±8,38^{ab}	8,75±7,11^{ab}	4,17±4,69^{ab}
R100	66,25±6,44	47,50±5,44^{bcd}	37,08±5,82^{bcd}	29,58±7,27^{abc}	23,75±7,72^{abc}	15,83±7,33^{bcd}	11,67±8,35^{abc}	5,83±5,15^{b}	2,08±2,58^{ab}
R150	66,25±6,44	43,33±7,18^{d}	31,67±9,85^{d}	23,75±9,07^{c}	17,50±7,23^{c}	11,67±7,18^{d}	6,67±6,16^{c}	2,92±4,98^{b}	1,25±3,11^{b}
Persentase hidup									
DV0	78,89±2,27	72,63±3,98	67,33±4,27	59,43±5,51	52,77±7,27^{ab}	43,72±6,98^{abc}	35,63±7,15^{abcd}	27,69±5,92^{bcde}	18,90±2,89^{bcd}
F50	78,89±2,27	73,10±4,36	68,25±4,75	60,68±5,14	54,63±5,87^{a}	47,03±5,69^{a}	39,84±7,56^{a}	32,20±7,58^{a}	23,53±6,74^{a}
F100	78,89±2,27	72,77±4,56	66,79±5,41	59,18±5,69	52,78±5,86^{ab}	44,42±6,19^{abc}	37,34±8,11^{abc}	29,16±6,66^{abc}	20,76±5,25^{abc}
F150	78,89±2,27	72,41±4,44	65,91±4,67	58,59±4,52	51,19±6,25^{ab}	42,67±6,71^{abc}	35,12±6,27^{abad}	26,87±5,59^{bcde}	18,95±4,05^{bcd}
T50	78,89±2,27	73,36±4,26	66,63±4,83	60,35±4,37	52,23±4,41^{ab}	45,05±3,47^{abc}	37,74±4,38^{abc}	28,83±3,39^{abcd}	21,19±3,40^{ab}
T100	78,89±2,27	72,22±5,30	65,22±6,40	57,98±5,46	49,92±4,99^{ab}	41,64±3,53^{bc}	33,68±2,71^{bcd}	25,07±2,59^{cde}	17,66±1,89^{cd}
T150	78,89±2,27	71,41±4,14	64,91±4,83	57,73±4,73	47,98±4,95^{b}	40,52±3,06^{c}	31,89±3,12^{d}	24,03±2,75^{e}	16,69±1,68^{d}
R50	78,89±2,27	72,14±5,02	66,03±5,36	59,96±5,67	50,65±7,52^{a}	45,98±5,37^{ab}	38,29±5,38^{ab}	29,99±4,87^{ab}	21,43±3,97^{ab}
R100	78,89±2,27	71,78±4,09	65,18±6,24	58,43±6,15	50,71±5,17^{ab}	42,27±5,26^{abc}	34,03±4,40^{bcd}	24,62±2,81^{de}	17,72±2,15^{cd}
R150	78,89±2,27	71,25±4,96	64,85±6,17	57,19±5,74	50,65±7,52^{ab}	40,91±5,67^{c}	32,60±4,65^{c}	24,13±2,39^{e}	16,29±2,42^{d}

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$);
DV0 : pengencer DV tanpa suplementasi;
F50, F100, F150 : pengencer DV disuplementasi fruktosa 50 mM, 100 mM atau 150 mM;
T50, T100, T150 : pengencer DV disuplementasi trehalosa 50 mM, 100 mM atau 150 mM;
R50, R100, R150 : pengencer DV disuplementasi rafinosa 50 mM, 100 mM atau 150 mM.

Tabel 3. Rataan persentase motilitas dan presentase hidup semen cair yang disimpan perlakuan pada suhu lemari es (3-5 ^{o}C) (%)

Perlakuan	Lama penyimpanan (jam)								
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
Persentase motil progresif									
DV0	$66,25\pm6,44$	$53,33\pm5,37^{ab}$	$44,58\pm7,82^{ab}$	$35,42\pm7,82^{ab}$	$27,50\pm8,39^{ab}$	$19,58\pm7,53^{abc}$	$12,08\pm6,89^{abc}$	$6,67\pm5,37^{ab}$	$3,33\pm3,89^{ab}$
F50	$66,25\pm6,44$	$54,58\pm4,98^{a}$	$47,50\pm9,65^{a}$	$38,33\pm11,93^{a}$	$30,83\pm11,04^{a}$	$25,00\pm9,29^{a}$	$17,92\pm8,91^{a}$	$12,08\pm8,38^{a}$	$5,42\pm6,20^{a}$
F100	$66,25\pm6,44$	$52,08\pm7,82^{ab}$	$43,75\pm9,78^{abc}$	$35,42\pm10,97^{ab}$	$28,33\pm9,85^{ab}$	$21,25\pm9,32^{abc}$	$14,17\pm8,48^{ab}$	$7,50\pm7,83^{ab}$	$2,92\pm4,98^{ab}$
F150	$66,25\pm6,44$	$49,58\pm8,11^{abc}$	$41,67\pm10,94^{abc}$	$33,75\pm12,27^{ab}$	$26,25\pm10,25^{ab}$	$18,75\pm9,08^{abcd}$	$12,50\pm7,83^{abc}$	$6,25\pm6,08^{b}$	$2,08\pm3,34^{ab}$
T50	$66,25\pm6,44$	$52,50\pm3,37^{ab}$	$45,00\pm7,07^{ab}$	$37,92\pm8,65^{a}$	$30,00\pm8,53^{a}$	$22,92\pm7,82^{ab}$	$14,58\pm7,22^{ab}$	$8,75\pm6,78^{ab}$	$3,75\pm4,83^{ab}$
T100	$66,25\pm6,44$	$49,58\pm6,20^{abc}$	$40,83\pm7,93^{abc}$	$30,83\pm9,00^{abc}$	$24,17\pm8,21^{abc}$	$17,92\pm8,65^{abcd}$	$10,00\pm6,39^{bc}$	$5,00\pm65,64^{b}$	$2,08\pm2,58^{ab}$
T150	$66,25\pm6,44$	$46,25\pm7,72^{cd}$	$36,25\pm9,32^{cd}$	$26,67\pm10,08^{bc}$	$20,42\pm8,65^{bc}$	$14,17\pm8,75^{cd}$	$6,67\pm6,85^{c}$	$3,75\pm5,28^{b}$	$1,25\pm2,26^{b}$
R50	$66,25\pm6,44$	$52,92\pm4,98^{ab}$	$43,33\pm7,11^{abc}$	$36,25\pm8,56^{a}$	$28,75\pm8,56^{a}$	$20,42\pm7,53^{abc}$	$14,58\pm8,38^{ab}$	$8,75\pm7,11^{ab}$	$4,17\pm4,69^{ab}$
R100	$66,25\pm6,44$	$47,50\pm5,44^{bcd}$	$37,08\pm5,82^{bcd}$	$29,58\pm7,27^{abc}$	$23,75\pm7,72^{abc}$	$15,83\pm7,33^{bcd}$	$11,67\pm8,35^{abc}$	$5,83\pm5,15^{b}$	$2,08\pm2,58^{ab}$
R150	$66,25\pm6,44$	$43,33\pm7,18^{d}$	$31,67\pm9,85^{d}$	$23,75\pm9,07^{c}$	$17,50\pm7,23^{c}$	$11,67\pm7,18^{d}$	$6,67\pm6,16^{c}$	$2,92\pm4,98^{b}$	$1,25\pm3,11^{b}$
Persentase hidup									
DV0	$78,89\pm2,27$	$72,63\pm3,98$	$67,33\pm4,27$	$59,43\pm5,51$	$52,77\pm7,27^{ab}$	$43,72\pm6,98^{abc}$	$35,63\pm7,15^{abcd}$	$27,69\pm5,92^{bcde}$	$18,90\pm2,89^{bcd}$
F50	$78,89\pm2,27$	$73,10\pm4,36$	$68,25\pm4,75$	$60,68\pm5,14$	$54,63\pm5,87^{a}$	$47,03\pm5,69^{a}$	$39,84\pm7,56^{a}$	$32,20\pm7,58^{a}$	$23,53\pm6,74^{a}$
F100	$78,89\pm2,27$	$72,77\pm4,56$	$66,79\pm5,41$	$59,18\pm5,69$	$52,78\pm5,86^{ab}$	$44,42\pm6,19^{abc}$	$37,34\pm8,11^{abc}$	$29,16\pm6,66^{abc}$	$20,76\pm5,25^{abc}$
F150	$78,89\pm2,27$	$72,41\pm4,44$	$65,91\pm4,67$	$58,59\pm4,52$	$51,19\pm6,25^{ab}$	$42,67\pm6,71^{abc}$	$35,12\pm6,27^{abad}$	$26,87\pm5,59^{bcde}$	$18,95\pm4,05^{bcd}$
T50	$78,89\pm2,27$	$73,36\pm4,26$	$66,63\pm4,83$	$60,35\pm4,37$	$52,23\pm4,41^{ab}$	$45,05\pm3,47^{abc}$	$37,74\pm4,38^{abc}$	$28,83\pm3,39^{abcd}$	$21,19\pm3,40^{ab}$
T100	$78,89\pm2,27$	$72,22\pm5,30$	$65,22\pm6,40$	$57,98\pm5,46$	$49,92\pm4,99^{ab}$	$41,64\pm3,53^{bc}$	$33,68\pm2,71^{bcd}$	$25,07\pm2,59^{cde}$	$17,66\pm1,89^{cd}$
T150	$78,89\pm2,27$	$71,41\pm4,14$	$64,91\pm4,83$	$57,73\pm4,73$	$47,98\pm4,95^{b}$	$40,52\pm3,06^{c}$	$31,89\pm3,12^{d}$	$24,03\pm2,75^{e}$	$16,69\pm1,68^{d}$
R50	$78,89\pm2,27$	$72,14\pm5,02$	$66,03\pm5,36$	$59,96\pm5,67$	$50,65\pm7,52^{a}$	$45,98\pm5,37^{ab}$	$38,29\pm5,38^{ab}$	$29,99\pm4,87^{ab}$	$21,43\pm3,97^{ab}$
R100	$78,89\pm2,27$	$71,78\pm4,09$	$65,18\pm6,24$	$58,43\pm6,15$	$50,71\pm5,17^{ab}$	$42,27\pm5,26^{abc}$	$34,03\pm4,40^{bcd}$	$24,62\pm2,81^{de}$	$17,72\pm2,15^{cd}$
R150	$78,89\pm2,27$	$71,25\pm4,96$	$64,85\pm6,17$	$57,19\pm5,74$	$50,65\pm7,52^{ab}$	$40,91\pm5,67^{c}$	$32,60\pm4,65^{c}$	$24,13\pm2,39^{e}$	$16,29\pm2,42^{d}$

Keterangan: Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$);
DV0 : pengencer DV tanpa suplementasi;
F50, F100, F150 : pengencer DV disuplementasi fruktosa 50 mM, 100 mM atau 150 mM;
T50, T100, T150 : pengencer DV disuplementasi trehalosa 50 mM, 100 mM atau 150 mM;
R50, R100, R150 : pengencer DV disuplementasi rafinosa 50 mM, 100 mM atau 150 mM.

misalnya *hydroxynonenal*. Peroksidasi asam lemak pada spermatozoa kuda dan sapi terutama ditemukan pada daerah *midpiece* (Neild *et al.*, 2002). Efek peroksidasi pada spermatozoa domba, babi, kuda, manusia, kelinci dan sapi menyebabkan kehilangan motilitas permanen, penghambatan fruktolisis dan respirasi, serta kerusakan enzim intraseluler dan struktur membran (Hammerstedt, 1993; White, 1993; Windsor *et al.,* 1993). Penambahan lesitin kuning telur ke dalam media akan berikatan dengan membran sehingga membatasi reaksi oksigen dengan asam lemak pada membran spermatozoa, sehingga akan mengurangi peroksidasi asam lemak (Hammerstedt, 1993).

Kerentanan semen kuda terhadap pengenceran dan pendinginan bervariasi diantara bangsa, frekuensi ejakulat, umur dan musim (Aurich *et al.,* 1996; Dowsett & Knott, 1996). Penggantian plasma semen kuda dengan plasma semen dari kuda lain yang relatif tahan terhadap pengenceran dan pendinginan, meningkatkan %M dan integritas membran (Aurich *et al.* 1996). Hal ini diduga oleh peran kolesterol atau senyawa lain yang mampu menahan kolesterol membran selama pengenceran dan pendinginan.

Suplementasi berbagai karbohidrat tidak berpengaruh nyata dalam penelitian ini. Hal ini mengisyaratkan adanya kespesifikan karbohidrat yang dibutuhkan untuk sumber energi dan *anti-cold shock* pada spermatozoa kuda. Hal ini berbeda dengan domba, yang menunjukkan bahwa suplementasi trehalosa dan EDTA mampu mempertahankan %M, %H dan integritas akrosom semen beku (Aisen *et al.,* 2000). Singh *et al.* (1994) menyatakan bahwa pengencer tris-fruktosa-kuning telur pada spermatozoa kerbau Murrah lebih baik dalam mempertahankan daya hidup (viability) semen beku dibandingkan dengan tris-glukosa-kuning telur dan tris-laktosa-kuning telur. Sementara itu pada anjing, walaupun penambahan berbagai karbohidrat tidak berpengaruh terhadap %M dan %H setelah ekuilibrasi, tetapi fruktosa, xylosa dan trehalosa mampu meningkatkan total spermatozoa aktif (%M x %H x % akrosom normal) setelah pembekuan (Yildiz *et al.,* 2000).

KESIMPULAN

Semen segar hasil koleksi mempunyai kualitas cukup baik, dengan rataan volume sebesar 29,25±9,33 ml, pH sebesar 7,00±0,12, %M sebesar 67,08±9,08, %H sebesar 77,89±6,46, konsentrasi sebesar 211,88±21,15 x 10^6/ml, spermatozoa total sebesar 6,28 ±2,45 x 10^9/ejakulat dan abnormalitas sebesar 27,26±4,64%. Berdasarkan %M dan %H, suplementasi berbagai karbohidrat (fruktosa, trehalosa dan rafinosa) kedalam media Dimitropoulos, baik pada penyimpanan dalam suhu ruang maupun suhu lemari es tidak secara signifikan mampu mempertahankan kualitas semen cair, kecuali fruktosa 50 mM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada manajemen Athena Stable Sawangan (Depok) yang telah mengijinkan pemakaian kuda selama penelitian. Penghargaan yang tulus disampaikan kepada Prof. Mozes R. Toelihere (Alm) yang dengan dedikasi tinggi telah mencurahkan pikiran untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

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

Aurich J.E., A. Kuhne, H. Hoppe & C. Aurich. 1996. Seminal plasma affects Membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. Theriogenology 46:791-797.

[BPS] Badan Pusat Statistik. 2003. Statistik Indonesia 2003. Badan Pusat Statistik, Jakarta.

Brinsko S.P., E.C. Crockett & E.L. Squires. 2000a. Effects of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. Theriogenology 54:291-136.

Brinsko S.P., G.S. van Wagner, J.K. Graham & E.L. Squires. 2000b. Motility, morphologi and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. J. Reprod. Fertil. (supp) 56:111-120.

Devireddy R.V., D.J. Swannlund, A. S. Alghamdi, M.H.T. Troedsson, Bischof & K.P. Roberts. 2002. The effect of collection and cooling conditions on water transport characteristic of equine spermatozoa. Theriogenology 58:233-236.

[Ditjennak Deptan dan Asohi] Direktorat Jenderal Peternakan – Departemen Pertanian RI dan Asosiasi Obat Hewan Indonesia. 1999. Buku Statistik Peternakan. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan – Departemen Pertanian RI dan Asosiasi Obat Hewan Indonesia.

Dowsett K.F. & L.M. Knott. 1996. The influence of age and nreed on stallion semen. Theriogenology 46(3):398-409.

Hafez E.S.E. & B. Hafez. 2000. Reproductive Cycle: Horses. In: E.S.E. Hafez & B. Hafez (eds). Reproduction In Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.

Hammerstedt, R.H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxydation: A Review of the Effect on Storage Presevation System. Reprod. Fetil. Dev. 5: 675-690.

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

Kayser J.P., R.P. Amann, R.K. Shidefer, E.L. Squires, D.J. Jasko & B.W. Pickett. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology 38:601-614.

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

Moran, D, D.J. Jasko, E.L. Squires & R.P. Amann. 1992. Determination of temperature and cooling rate which induced cold shock in stallion spermatozoa. Theriogenology 38: 999-1012.

Neild, D.M., B.M. Gadella, B. Colenbrander, A. Aquero & J.F.H.M. Brouwers. 2002. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. Theriogenology 58:295-298.

Pommer A.C., J. Ruttlant & S.A. Meyers. 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. Theriogenology 58:1373-1384.

Rauge, M. 2003. Collection and Evaluation of Semen. http://arbl.cvmbs.colostate. edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/index.html [21 November 2005].

Sieme H., T. Katila & E. Klug. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallion. Theriogenology 61:769-784.

Singh T.I., B.N. Mohanty, D.N. Mohanty & S.K.H. Ray. 1994. Effects of extenders on the freezability of buffalo semen. Indian Vet. J. 71:508-509.

Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. CV Angkasa, Bandung.

White, I.G. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. Reprod. Fertil. Dev. 5: 639-658.

Windsor, D.P., I.G. White, M.L. Selley & M.A. Swan. 1993. Effect of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. J. Reprod. Fertil. 99: 359-366.

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.