

Efektivitas Waktu Pemaparan Gliserol terhadap Motilitas Spermatozoa pada Pembekuan Semen Domba Lokal Menggunakan Pengencer Tris Kuning Telur

(The Effect of Glycerolisation Time on the Sperm Motility of Local Ram Frozen Semen Diluted in Tris Egg Yolk Extender)

Tuty Laswardi Yusuf, Raden Iis Arifiantini dan Yadi Mulyadi

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

Abstract

The aims of this experiment was to obtain the effects of different time of glycerolisation on the quality of frozen ram semen diluted in Tris Egg Yolk (TEY). Semen from seven sexually mature local rams were collected using artificial vagina weekly, evaluated macroscopically and microscopically. Good quality semen then diluted with TEY and 5% glycerol added in three different periods. The first step was diluted in room temperature (treatment 1), the second glycerolisation was at the end of equilibration (treatment 2) and the third period was several steps of glycerolisation during equilibration (treatment 3). Diluted semen was packed in straws (Minitub, Germany), equilibrated at 5°C for three hours, freezed in liquid nitrogen vapor for 10 minutes and then stored in a container of -196 °C liquid nitrogen. After 24 hours, the semen was thawed at 37°C for 30 second. The results of showed that there was no significant differences among treatments ($P > 0.05$). The percentage of post thawing motility was 42.50% (treatment 1), compared to 38.75% (treatment 2), and 30.00% (treatment 3). In conclusion, the glycerolization on frozen ram semen can be done any time of the equilibration without influencing the sperm motility.

Key Words: Glycerolisation, equilibration, ram semen

Pendahuluan

Keberhasilan inseminasi buatan pada ternak domba dipengaruhi beberapa faktor diantaranya adalah kualitas semen cair atau semen beku yang digunakan. Untuk menghasilkan semen beku domba yang berkualitas dibutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan maupun pada saat *thawing* (Aboagla dan Terada, 2004a). Salah satu komponen penting yang harus ditambahkan pada bahan pengencer semen beku adalah krioprotektan. Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen adalah gliserol, yang merupakan krioprotektan intraseluler dengan berat molekul 92,10 (Hafez, 2000).

Gliserol akan melindungi sel spermatozoa pada saat pembekuan dari kristal es tajam yang akan merusak membran spermatozoa (Park dan Graham, 1992). Disamping fungsinya sebagai krioprotektan, gliserol juga bersifat toksik, sehingga beberapa peneliti menganjurkan untuk melakukan pemaparan gliserol sesaat sebelum pembekuan.

Konsentrasi gliserol pada pengencer berbeda-beda. Rizal *et al.* (2003) melaporkan konsentrasi gliserol 5% dalam pengencer tris kuning telur pada pembekuan semen domba garut menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan konsentrasi gliserol 3% dan 7%. Hasil ini diperkuat oleh Herdis (2005) pada semen beku domba yang sama. Penelitian Fiser dan Fairfull, (1986) pada semen domba menggunakan

konsentrasi gliserol 1 sampai dengan 16% menunjukkan hasil yang optimum adalah 4-6%. Konsentrasi gliserol 7% pada pengencer tris dilaporkan oleh Feradis, (1999) pada domba St. Croix dengan motilitas pasca *thawing* yang memuaskan. Dalam penelitian ini, akan dikaji waktu pemaparan gliserol (gliserolisasi) dalam pengencer tris kuning telur, satu tahap pada awal pengenceran, satu tahap setelah ekuilibrasi dan bertahap selama ekuilibrasi. Dari penelitian ini diharapkan akan dihasilkan metode pembekuan semen domba yang lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa pasca *thawing*.

Metode Penelitian

Materi

Hewan percobaan yang digunakan adalah tujuh ekor domba lokal jantan dewasa berumur 2-3 tahun dengan bobot badan 25-29 kg. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput segar sebanyak 5 kg dan tambahan konsentrat sebanyak $\frac{1}{4}$ kg ekor⁻¹ hari⁻¹ dan air minum diberikan *ad libitum*.

Metode

1. Penampungan dan Evaluasi Kualitas Semen Segar

Semen ditampung satu kali dalam satu minggu menggunakan vagina buatan sebanyak 2 ejakulat dalam satu kali penampungan sebanyak 4 kali ulangan. Penilaian semen dilakukan secara makroskopis meliputi warna, volume (mL), pH, konsistensi dan secara mikroskopis yaitu gerakan massa, konsentrasi spermatozoa mL⁻¹ dan motilitas sperma (% SM). Gerakan massa dilakukan dengan cara meneteskan satu tetes semen menggunakan pipet Pasteur di atas gelas objek, lalu diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 X. Nilai gerakan massa terdiri

dari sangat baik (+++), baik (++) , cukup (+) dan buruk (-). Untuk melihat % SM dilakukan dengan menambahkan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1 berbanding 6 tetes, diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 X dan dinilai secara subyektif dari 5 lapang pandang skala 0-5%; penilaian dimulai dari 0% tidak bergerak sampai 100% bergerak seluruhnya (Parish's, 2003). Pengamatan konsentrasi dilakukan menggunakan kamar hitung *Neubauer* dengan bahan pengencer eosin 0,20%.

2. Pengenceran Semen

Semen segar yang memenuhi syarat (gerakan massa +++, sperma motil >70%, konsentrasi >2000 juta per ml) di pool menjadi satu dan diencerkan sesuai dengan perlakuan dengan jumlah spermatozoa per straw 100 juta spermatozoa.

Pengenceran semen yang digunakan adalah Tris kuning telur (TKT) dengan komposisi *buffer* Tris (BT) terdiri dari Tris (*hydroxymethyl aminomethane*) 2,42 g; asam sitrat 1,36 g; fruktosa 0,88 g dan aquadest sampai mencapai 100 ml. Selanjutnya dibuat tiga macam bahan pengencer yaitu pengencer A yang terdiri dari BT 80%, kuning telur (KT) 20% (v/v). Pengencer B terdiri dari BT 74%, KT 20% dan gliserol (G) 6% (v/v) dan pengencer C terdiri dari BT 68%, KT 20% dan G 12% (v/v) setiap pengencer ditambah antibiotik penisilin 1000 IU dan streptomycin 1 mg per ml bahan pengencer semen.

a. Pemaparan gliserol satu tahap (GST)

Semen dilarutkan dengan pengencer B (yang didalamnya sudah mengandung gliserol) pada suhu ruang secara perlahan-lahan tetes demi tetes, kemudian dikemas dalam straw 0.3 mL (Minitub, Jerman) dan selanjutnya diekuilibrasi dalam lemari es (3-5°C) selama tiga jam.

b. Pemaparan gliserol pada akhir ekuilibrasi (GAE)

Semen dicampur pada suhu ruang dengan pengencer A dan disimpan dalam lemari es (3-5°C) selama tiga jam. Setelah tiga jam ditambahkan gliserol 6% (v/v) secara perlahan-lahan tetes demi tetes, kemudian semen langsung dikemas dalam *straw* (gliserol, peralatan dan pengemasan dilakukan dalam lemari es).

c. Pemaparan gliserol bertahap (GBT)

Semen dicampur dengan pengencer A (tanpa gliserol) setengah dari volume pengenceran dan dimasukkan ke dalam lemari es. Setelah satu jam, semen tersebut ditambahkan pengencer C yang disimpan pada suhu yang sama seperempat volume pengenceran secara bertahap setiap satu jam sebanyak dua kali. Selanjutnya dilakukan ekuilibrasi lanjutan selama satu jam dan kemudian semen dikemas dalam *straw*. Pengemasan dan semua peralatan yang digunakan disimpan dan dilakukan dalam lemari es.

3. Pembekuan

Setelah ekuilibrasi tiga jam (perlakuan pertama) dan setelah ekuilibrasi serta pengemasan (untuk perlakuan kedua dan ketiga). Dilanjutkan dengan proses pembekuan. Pembekuan menggunakan boks styrofoam yang berukuran 30X30 cm dan diisi nitrogen (N₂) cair setinggi 7 cm. *Straw* ditempatkan pada rak pembekuan dengan jarak 3 cm dari permukaan N₂ cair, selama sepuluh menit. Suhu uap nitrogen cair ini diperkirakan -130°C. Setelah beku, *straw* disimpan dalam kontainer N₂ cair (-196°C).

4. Thawing

Untuk mengetahui keberhasilan pembekuan, semen beku dicairkan kembali (*thawing*) dengan air hangat bersuhu 37°C selama 30 detik dan semen dikeluarkan seluruhnya dari *straw* pada

gelas objek yang telah dihangatkan. Satu tetes semen diambil dan ditutup dengan gelas penutup.

5. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah motilitas yang dinilai secara subyektif kuantitatif pada sepuluh lapang pandang dengan jumlah sel spermatozoa per lapang pandang antara 10 dan 20 sel (Sorenson, 1979) pada beberapa tahap yaitu pada semen segar, pasca pengenceran dan pasca *thawing*. Data yang diperoleh dari hasil PTM dianalisis dengan sidik ragam Rancangan Acak Lengkap (ANOVA) jika ada perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan ($\alpha = 0,05$).

Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Semen Segar

Hasil evaluasi semen segar secara makroskopis menunjukkan bahwa rata-rata volume yang didapat $0,66 \pm 0,09$ mL; pH $6,88 \pm 0,01$; berwarna krem dengan konsistensi yang kental. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi semen tinggi, sedangkan secara mikroskopis gerakan massa yang nampak adalah +++ , dengan konsentrasi spermatozoa $2418,75 \pm 96,03$ juta mL⁻¹ dan SM $75,00 \pm 4,08\%$ (Tabel 1).

Pengaruh Waktu Pemaparan Gliserol Terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa yang dinilai adalah gerakan spermatozoa yang maju ke depan (progresif). Meskipun tidak mempunyai korelasi langsung dengan fertilitas (Hafez dan Hafez, 2000), tetapi merupakan parameter utama yang banyak dilaporkan oleh para peneliti. Hasil penelitian waktu pemaparan gliserol ini tidak mempengaruhi % SM ($P > 0,05$). Motilitas pasca *thawing* (PTM) perlakuan pemaparan

Tabel 1. Rataan nilai karakteristik semen segar domba lokal

Karakteristik Semen	Nilai Rataan
Volume (mL)	0,66 ± 0,09
Warna	Krem
Konsistensi	Kental
pH	6,88 ± 0,01
Gerakan massa	+++
Sperma motil (%)	75,00 ± 4,08
Konsentrasi spermatozoa (x 10 ⁶ mL ⁻¹)	2418,75 ± 296,03

Tabel 2. Motilitas spermatozoa semen segar pascaekuilibrasi dan pascat^hawing dengan waktu pemaparan gliserol dalam pengencer tris kuning telur yang berbeda

Tahapan pengamatan	Spermatozoa motil (%) pada tiga metode pemaparan gliserol		
	GST	GAE	GBT
Semen segar	75,00±4,08 ^a	75,00±4,08 ^a	75,00±4,08 ^a
Pascaekuilibrasi	70,00±4,08 ^a	75,00±4,08 ^a	67,50±5,00 ^a
Pascat ^h awing	42,50±5,00 ^a	38,75±2,50 ^a	30,00±0,00 ^a

GST = pemaparan gliserol satu tahap; GAE = pemaparan gliserol pada akhir ekuilibrasi) dan
GBT = pemaparan gliserol bertahap

gliserol satu tahap (GST) 42,50±5,00%, pemaparan gliserol pada akhir ekuilibrasi (GAE) 38,75±2,50% dan pemaparan gliserol bertahap (GBT) 30,00±0,00% (Tabel 2).

Penurunan motilitas spermatozoa semen segar sampai dengan pasca *thawing* tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Penurunan % SM dari seluruh perlakuan berkisar antara 32,50 sampai dengan 45,00%, penurunan % SM terendah terjadi antara semen segar ke pasca ekuilibrasi yaitu 5,00±0,00 sampai dengan 7,50±2,89%. Penurunan tertinggi pada pasca ekuilibrasi sampai dengan pasca *thawing* (27,50 sampai dengan 36,25%) (Tabel 3).

Pada akhir ekuilibrasi perlakuan GAE, menunjukkan % SM (75,00±4,08) yang lebih tinggi dibandingkan GST (70,00±4,08%) maupun GBT (67,50±5,00%). Hal ini disebabkan karena GAE sampai akhir ekuilibrasi tidak dipengaruhi oleh tekanan osmotik yang tinggi dari gliserol dibandingkan GST maupun GBT. Tanpa

pemaparan gliserol pada pengencer A yang terdapat pada GAE, tekanan osmotik dari hanya berkisar antara 285 sampai dengan 325 mosmol sedangkan pada GST dan GBT yang dipaparkan dengan gliserol langsung maupun bertahap selama ekuilibrasi dipengaruhi oleh tingginya tekanan osmotik dari larutan pengencer B maupun A dan C yang dapat mencapai 800 – 1000 mosmol (Herdis, 2005).

Perlakuan GAE tidak memperbaiki motilitas PTM, hal ini mungkin disebabkan waktu penambahan gliserol pada akhir ekuilibrasi ke proses pembekuan terlalu singkat, sehingga efek perlindungan gliserol terhadap spermatozoa selama proses pengenceran dan pembekuan tidak maksimal. Efek perlindungan yang diberikan gliserol pada spermatozoa adalah memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk selama proses pembekuan serta tidak menyebabkan penumpukan elektrolit. Kristal – kristal es akan merusak

Tabel 3. Penurunan persentase motilitas spermatozoa pada setiap tahapan pengamatan

Tahapan pengamatan	Perlakuan		
	GST	GAE	GBT
Semen segar ke pasca ekuilibisasi	5,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	7,50 ± 2,89 ^a
Pascaekuilibisasi ke pasca <i>thawing</i>	27,50 ± 8,56 ^a	36,25 ± 4,79 ^a	37,50 ± 5,00 ^a
Semen segar ke pasca <i>thawing</i>	32,50 ± 8,66 ^a	36,25 ± 4,79 ^a	45,00 ± 4,08 ^c

GST = pemaparan gliserol satu tahap; GAE = pemaparan gliserol pada akhir ekuilibisasi dan

GBT = pemaparan gliserol bertahap

organel-organel spermatozoa, seperti mitokondria yang akan mengakibatkan proses oksidasi terputus sehingga proses metabolisme di dalam sel tidak terjadi (Park dan Graham, 1992)

Perlakuan GBT pada penelitian menunjukkan PTM yang paling rendah 30% dengan tingkat penurunan % SM dari semen segar ke pasca *thawing* tertinggi 45,00±4,08% , hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Fabbrocini *et al.* (2000), yang melaporkan bahwa penambahan gliserol dalam pengencer dengan metode dua tahap pada akhir ekuilibisasi menghasilkan PTM yang lebih baik dibandingkan penambahan gliserol satu tahap. Hal ini diduga karena faktor individual, pengencer dan metode penambahan gliserol yang berbeda. Penurunan % SM yang paling tinggi yaitu sebesar 45,00±4,08% pada GBT dibandingkan perlakuan GST (32,50±8,66%) dan GAE (36,25±4,79%). Penurunan %SM GBT ini kemungkinan karena pengaruh gliserol yang ditambahkan secara bertahap mengakibatkan spermatozoa harus lebih sering beradaptasi dengan perbedaan tekanan osmotik dari pengencer. Selain perubahan tekanan osmotik yang berulang-ulang hal lain yang memberikan kontribusi adalah penggunaan lemari es biasa (*home refrigerator*) dan tidak menggunakan *cool top* (lemari es dengan pintu di atas) yang dapat diatur kelebarannya. Penggunaan lemari es biasa dengan gliserolisasi yang berulang-ulang pada perlakuan GBT menyebabkan suhu didalam lemari es berubah-ubah, sehingga suhu yang tidak konstan ini juga sangat mempengaruhi kualitas spermatozoa (Aboagla dan Terada, 2004b)

Penurunan motilitas spermatozoa pada penelitian ini 32,50 – 45,00% hampir sama dengan penurunan pada domba garut yaitu berkisar antara 36,67-44,17% (Rizal *et al.*, 2002) dan sebesar 24,29% pada kambing PE (Tambung, 1999). Penurunan motilitas pada proses pembekuan semen umumnya dapat berkisar antara 10-80% (Partodihardjo, 1992) dengan rata-rata 50% (Sorenson, 1979). Penurunan motilitas tersebut disebabkan akibat kejutan dingin (*cold shock*) berupa kontraksi selubung lipoprotein sel spermatozoa yang disebabkan oleh tingginya ion Ca^{2+} intraseluler dan intoksikasi ion Ca^{2+} (Toelihere, 1985).

Selain gliserol penambahan kuning telur pada pengencer juga mampu memberikan efek perlindungan pada spermatozoa selama proses pendinginan dan pembekuan. Fraksi protein non dialisis pada kuning telur yang mengakibatkan kuning telur dapat mempunyai sifat proteksi yang sangat baik pada spermatozoa domba selama penyimpanan dingin. Selain itu diduga karena adanya kaitan yang erat antara *low density lipoprotein* dengan membran plasma sperma seperti yang ditemukan pada spermatozoa sapi (Molinia *et al.*, 1994).

Kesimpulan

Hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu pemaparan gliserol (gliserolisasi) yang berbeda tidak mempengaruhi persentase motilitas spermatozoa pasca *thawing* semen beku domba lokal dengan pengencer tris kuning telur.

Daftar Pustaka

- Aboagla, EM-E and T. Terada, 2004a. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62 : 1160-1172.
- Aboagla, EM-E and T. Terada, 2004b. Effects of supplementation of trehalosa extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62 : 809-818.
- Fabbrocini A., C. Del Sorbo, G. Fasano and G. Sansone, 2000. Effect of different addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (*B. bubalis*) Spermatozoa. *Theriogenology* 54 : 262 - 271.
- Feradis, 1999. Penggunaan antioksidan dalam pengencer semen beku dan metode sinkronisasi estrus pada program inseminasi buatan domba St. Croix. *Disertasi* Program Doktor. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Fiser, P.S and R.W. Fairfull, 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology* 25: 473-484.
- Hafez, E. S. E., 2000. Preservation and cryopreservation of gamet and embryo dalam E.S.E. Hafez, and B Hafez (Eds.) *Reproduction In Farm Animals*. 7th Ed Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
- Herdis, 2005. Optimalisasi inseminasi buatan melalui aplikasi teknologi laserfunktur pada domba garut. *Disertasi* Program Doktor. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Molinia F.C, G. Evans and W.M.C. Maxwell., 1994. Incorporation of penetrating cryoprotectants. *Theriogenology* 42 : 849 - 858.
- Partodihardjo S., 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Mutiara, Jakarta.
- Park, J.E. and J.K. Graham, 1992. Effect of cryopreservation procedur on sperm membranes. *Theriogenology* 38 : 209-222.
- Parish's J, 2003. Web site University of Wisconsin Department of Animal Science for his Animal Sciences Reproductive Physiology class http://www.wisc.edu/ansci_repro/ (25 Juli 2003).
- Sorenson, Jr .AM., 1979. *Laboratory Manual for Animal Reproduction*. 4^{ed} American Press. Boston.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang, 2003. Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 7 (3) : 194 - 199.
- Tambing, S.N., 1999. Efektivitas berbagai dosis gliserol di dalam pengencer tris dan waktu ekuilibrisasi terhadap kualitas semen beku kambing peranakan etawah. *Tesis*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere, M.R., 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Angkasa. Bandung.