

KUALITAS SEMEN SAPI LIMOUSIN PADA PENGECER YANG BERBEDA SELAMA PENDINGINAN

Veronica Devita Bunga Wiratri, Trinil Susilawati dan Sri Wahjuningsih
Bagian Produksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang
e-mail : veronica_devita@yahoo.com ; trinil_susilawati@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi kualitas semen Sapi Limousin selama pendinginan. Karakteristik spermatozoa mudah rusak, sehingga perlu dilindungi daya hidup spermatozoa tersebut. Penambahan pengencer dilakukan untuk menentukan kualitas dan daya hidup spermatozoa. Setiap pengencer ditambahkan kuning telur sebagai bahan krioprotektan, perlakuan dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu P0 (CEP-2 + 10% kuning telur), P1 (Tris Aminomethan + 20% kuning telur), P2 (Skim + 10% kuning telur). Hasilnya menunjukkan bahwa Tris Aminomethan + 20% kuning telur memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas dan abnormalitas). Motilitas pada ketiga pengencer pada jam ke-24 berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). Selanjutnya, viabilitas dan abnormalitas menunjukkan berbeda sangat nyata sejak pengamatan jam ke-0 sampai jam ke-24. Tris Aminomethan menunjukkan hasil terbaik diantara pengencer lain karena penambahan 20% kuning telur, seperti yang telah diketahui bahwa kuning telur adalah krioprotektan ekstraseluler untuk melindungi dan menutrisi spermatozoa selama pendinginan.

Kata kunci : Kuning Telur, CEP-2, Tris Aminomethan, Skim

ABSTRACT

This study was done to evaluate quality of Limousin's semen during chilled preservation. The characteristic of spermatozoa were easily damaged, so that they were necessary to protect viability of spermatozoa. Addition of extender was conducted to determine quality and viability of spermatozoa. Each extender were added Egg Yolk as diluents cryopreservation, the treatment were divided in to three groups, they were ; P0 (CEP-2 + 10% Egg Yolk), P1 (Tris Aminomethane + 20% EggYolk), P2 (Skim + 10% Egg Yolk). The result showed that Tris Aminomethane + 20% Egg Yolk gave the best effect on maintaining quality of spermatozoa (motility, viability and abnormality). The motility in three extender at 24h was high significant different ($P < 0,01$). Furthermore, the Viability and abnormality showed high significant different ($P < 0,01$) since first time evaluation at 0h until 24h. Tris Aminomethane showed the best result among others due to the addition of 20% Egg Yolk, as we know that Egg Yolk was an extracellular cryoprotektan to protect and nourish spermatozoa during chilling preservation.

Keyword : Egg Yolk, CEP-2, Tris Aminomethane, Skim,

PENDAHULUAN

Terbatasnya populasi sapi di daerah-daerah karena mendapatkan sapi. Salah satu sarana guna terwujudnya peningkatan populasi dan mutu genetik sapi maka dilakukan pemanfaatan

bakalan masih sangat sulit, menyebabkan masih sulit pula untuk memenuhi kebutuhan daging nasional. Bioteknologi reproduksi peternakan melalui teknik Inseminasi Buatan (IB)

(Ervandi, Susilawati dan Wahyuningsih, 2013).

Kondisi spermatozoa yang mudah mengalami kerusakan pada saat perlakuan maupun penyimpanan membutuhkan pengencer yang dapat mempertahankan kualitas selama penyimpanan, maka pengencer harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, anti *cold shock*, antibiotik dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa dalam proses pendinginan dan pembekuan. Sumber nutrisi yang paling banyak digunakan adalah karbohidrat, terutama fruktosa, yang paling mudah dimetabolisasi oleh spermatozoa (Toelihere, 1993). Semen cair mulai dikembangkan kembali dengan menggunakan pengencer yang ada, baik pengencer konvensional maupun pengencer baru. Semen beku yang sering digunakan untuk IB memiliki kualitas yang lebih rendah dan hanya dapat dipertahankan apabila tersedia Nitrogen cair (N₂ cair) secara kontinyu, sedangkan di beberapa daerah di Indonesia N₂ cair sulit untuk didapatkan dan berdampak pada rendahnya keberhasilan IB. Sebagai alternatif perbaikan mutu genetik, berbagai pengencer perlu di uji coba untuk menentukan pengencer yang mampu mempertahankan kualitas semen pada suhu penyimpanan 3-5°C.

Tujuan penelitian adalah menguji perbedaan kualitas semen yang diencerkan dengan tiga jenis pengencer yang berbeda, yaitu CEP-2 + 10% kuning telur, Tris Aminomethan + 20% kuning telur dan Skim + 10% kuning telur.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian yang digunakan yaitu semen segar yang berasal pejantan Sapi Limousin yang dipelihara di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari yaitu Placid umur 6 tahun dengan bobot badan 1044 kg, Uchita umur 7 tahun dengan bobot badan 974 kg dan Kathandra umur 7 tahun dengan bobot badan 960 kg, penampungan semen menggunakan vagina buatan (*artificial vagina*). Pengambilan semen sapi Limousin dilakukan dengan

Pengencer *Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) adalah salah satu jenis pengencer untuk penyimpanan spermatozoa sapi pada suhu refrigerator. *Cauda Epididymal Plasma-2* mengandung sumber energi berupa fruktosa, beberapa mineral seperti (Na⁺, Ca²⁺, K⁺), pH serta osmolaritasnya sama pada keadaan plasma kauda epididymis (Verbeckmoes, VariSoom, Dewulf and De Kruif, 2004). Pengencer berbahan dasar Tris diketahui kemampuannya dalam memelihara daya hidup spermatozoa sapi (vanWagtendonk-deLeeuw *et al.*, 2000 disitasi oleh Suharyanti dan Hartono, 2011).

Pengencer Tris Aminomethan memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan baginya, antara lain fruktosa, laktosa, rafinosa, asam-asam amino dan vitamin dalam kuning telur sehingga spermatozoa dapat memperoleh sumber energi dalam jumlah yang cukup untuk. Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi membran sel spermatozoa untuk mencegah terjadinya *cold shock* selama pendinginan pada suhu 5°C (Susilawati, 2002 : Ducha, Susilawati, Aulani'am dan Wahyuningsih, 2013).

cara *purposive sampling*, yaitu menggunakan semen yang memiliki kriteria motilitas massa minimal ++ dan motilitas individu $\geq 55\%$ dengan frekuensi penampungan semen dua kali dalam seminggu. Semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen afkir yang tidak lolos untuk dilakukan prosesing oleh BBIB (motilitas dibawah 70%). Kuning telur yang digunakan adalah kuning telur dari ayam ras dengan umur maksimal empat hari. Bahan lain yang digunakan, yaitu eosin-negrosin sebagai pewarna pada uji viabilitas dan NaCl fisiologis 3%.

Metode penelitian yang digunakan adalah *experimental laboratory*, dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dan diteruskan menggunakan

Duncan Multiple Range Test, dengan 3 perlakuan dan 10 kali ulangan berdasarkan lama preservasi semen Semen segar akan diencerkan dengan tiga jenis pengencer yang berbeda yaitu P0 : CEP-2 + 10% kuning telur, P1 : Tris Aminomethan+ 20% kuning telur dan P2 : Skim + 10% kuning telur (susu tropicana slim).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Semen Segar

Semen segar yang ditampung diamati kualitas makroskopis dan mikroskopis. Hasil pemeriksaan secara mikroskopis menunjukkan motilitas massa berkisar 20% Susilawati (2011) ; Garner *and* Hafez (2008). Konsentrasi 1144,25 ± 556,48 juta/ml sudah sesuai dengan standar

++, sedangkan motilitas individu menunjukkan rata-rata 55 ± 0% dengan viabilitas 78,30 ± 1,69%. Toelihere (1993) menjelaskan bahwa standar persentase viabilitas hidup minimal 70% dari perhitungan minimal 200 sel spermatozoa per preparat. Hal ini dapat diketahui dari pemeriksaan mikroskopis menggunakan pewarnaan eosin-negrosin dan jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna. Persentase abnormalitas semen segar Sapi Limousin adalah 8,54 ± 1,833%, artinya semen tersebut memiliki sel spermatozoa yang baik. Abnormalitas semen maksimal

yaitu berjumlah ≥1000juta/ml (Susilawati, 2000). Hasil rata-rata pemeriksaan semen segar dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rataan Pemeriksaan Semen Segar Sapi Limousin

Variabel	Rata-rata SD
Sapi Sampel	
Umur (th)	6,75 ± 0,50
Bobot Badan (Kg)	988 ± 37,91
Uji Kualitas Semen Secara Makroskopis	
Volume per ejakulasi (ml)	6,75 ± 0,68
Warna	Putih Susu
pH	6,60 ± 0,16
Konsistensi	Sedang
Uji Kualitas Semen Secara Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	55 ± 0
Konsentrasi (juta/ml)	1144,25 ± 556,48
Viabilitas (%)	78,30 ± 1,69
Abnormalitas (%)	8,54 ± 1,83

Persentase Motilitas Spermatozoa selama Pendinginan

Hasil analisa ragam menunjukkan Tris Aminomethan + 20% kuning telur menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01) meningkat terhadap P0 dan P2 pada semen Sapi Limousin yang disimpan pada suhu 3-5°C pada jam ke-5 dan 24, artinya kemampuan Tris Aminomethan + 20% kuning telur mampu memberikan nutrisi bagi metabolisme spermatozoa dan melindungi lebih lama dari pengencer perlakuan lainnya (memiliki daya preservasi

paling baik). Aminah dan Layla (2001) melaporkan bahwa hasil penelitian tentang pengenceran semen kambing dengan pengencer tris, air kelapa, skim dan susu murni disimpulkan pengencer yang terbaik dalam mempertahankan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa adalah tris, kemudian diikuti oleh air kelapa, susu murni dan susu bubuk skim.

Penggunaan susu skim pada pengencer memberikan hasil yang kurang baik terhadap motilitas, hal ini didukung

oleh pendapat Suharyanti, dkk. (2011) bahwa persentase spermatozoa hidup pada pengencer susu skim lebih rendah karena kandungan laktosa yang tinggi mempercepat metabolisme spermatozoa dan terjadi penumpukan asam laktat menyebabkan spermatozoa mati, selain itu

lemak pada susu skim juga menghambat gerak spermatozoa. Berdasarkan ketiga pengencer tersebut layak digunakan untuk IB hingga penyimpanan jam ke-24 sesuai dengan standar, yaitu lebih besar sama dengan 40%.

Tabel 2. Rata-rata Persentase Motilitas Individu Pada Tiga Pengencer Selama Penyimpanan Suhu 3-5⁰C

Perlakuan	Lama Penyimpanan (Jam)						
	0	1	2	3	4	5	24
P0	55±0 ^a	54±1,29 ^a	53,75±1,76 ^a	51,75±1,68 ^a	51,25±1,76 ^a	50,5±1,97 ^a	39±3,07 ^b
P1	55±0 ^a	54,4±1,05 ^a	54±1,29 ^a	53±1,97 ^a	52,25±1,84 ^a	51,25±2,12 ^a	42,75±2,55 ^a
P2	54,25±1,20 ^a	53,25±2,05 ^a	53±1,97 ^a	51±1,74 ^b	50,5±2,58 ^b	49,25±2,37 ^b	36,50±4,32 ^b
Taraf Nyata	***	*	*	***	**	***	***

Keterangan :

- * : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata (P>0,05)
- ** : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)
- *** : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata (P<0,01)

Persentase Viabilitas Spermatozoa selama Pendinginan

Hasil analisis statistik menunjukkan nilai viabilitas mengalami perbedaan sangat nyata (P<0,01) mulai dari jam ke-0 hingga jam ke-24, artinya Tris Aminomethan + 20% kuning telur memberikan perbedaan viabilitas yang meningkat atau lebih tinggi daripada pengencer CEP-2 + 10% kuning telur dan Skim + 10% kuning telur. Hasil tersebut juga menyatakan bahwa P0 masih memiliki kemampuan mempertahankan viabilitas spermatozoa lebih baik

dibandingkan P2, hasil tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Penelitian Arifiantini (2010) melaporkan bahwa hasil analisa statistik *post thawing* menunjukkan persentase viabilitas tertinggi pada pengencer Tris Kuning telur (65,10 ± 4,26%), kemudian Andromed (65,06 ± 5,86%) dan Tris *soymilk* (58,30 ± 4,14%). Kemampuan Tris Aminomethan yang ditambahkan kuning telur memang memiliki daya preservasi yang sangat baik, sehingga dapat mempertahankan viabilitas lebih baik pula dibandingkan pengencer Tris *soymilk*

Tabel 3. Rata-rata Persentase Viabilitas Pada Tiga Pengencer Selama Penyimpanan Suhu 3-5⁰C

Perlakuan	Lama Penyimpanan (Jam)						
	0	1	2	3	4	5	24
P0	78,97±1,03 ^a	78,51±1,18 ^b	76,44±1,83 ^a	75,93±1,71 ^a	75,3±1,60 ^b	74,88±1,48 ^b	66,83±1,00 ^b
P1	79,26±0,75 ^a	79,07±0,53 ^a	77,23±1,71 ^a	76,6±2,04 ^a	76,24±1,68 ^a	75,84±1,62 ^a	68,94±1,22 ^a
P2	78,27±0,74 ^b	77,55±0,80 ^b	76,04±1,42 ^b	75,3±1,49 ^b	74,95±1,34 ^b	73,85±0,96 ^c	64,93±0,85 ^c
Taraf Nyata	***	***	***	***	***	***	***

Keterangan:

- ** : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Persentase Abnormalitas Spermatozoa selama Pendinginan

Hasil analisis ragam diketahui bahwa abnormalitas semen Sapi Limousin yang diencerkan dengan tiga jenis pengencer yang berbeda menunjukkan hasil yang sangat berbeda nyata ($P < 0,01$). Tris Aminomethan + 20% kuning telur memberikan perbedaan abnormalitas yang menurun atau lebih rendah daripada pengencer CEP-2 + 10% kuning telur dan disusul oleh Skim + 10% kuning telur. Pengencer Tris Aminomethan + 20% kuning telur memberikan hasil yang paling baik karena kandungan kuning telur dalam Tris Aminomethan lebih banyak daripada pengencer lain, yaitu sebanyak 20%.

Kerusakan sel dan abnormalitas akan meningkat saat pendinginan berlangsung, namun pengencer yang mengandung kuning telur akan melindungi dan mempertahankan integritas selubung spermatozoa karena adanya lesitin dan lipoprotein. Persentase abnormalitas pada spermatozoa 8-10% tidak memberikan pengaruh terhadap kualitas semen, namun jika lebih dari 25%, maka akan berpengaruh terhadap penurunan fertilitas (Parera dkk, 2009). Pada penelitian ini jumlah spermatozoa abnormal pada jam ke 24 masih berkisar pada angka 19% sehingga masih layak untuk IB. Rata – rata abnormalitas spermatozoa selama pendinginan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata Persentase Abnormalitas Pada Tiga Pengencer Selama Penyimpanan Suhu 3-5⁰C

Perlakuan	Lama Penyimpanan (Jam)						
	0	1	2	3	4	5	24
P0	10,42±0,64 ^b	11,44±0,69 ^b	12,51±0,61 ^b	13,25±0,39 ^b	14,07±0,36 ^b	14,99±0,37 ^b	19,01±0,46 ^b
P1	9,23±0,42 ^a	9,86±0,26 ^a	10,91±0,50 ^a	11,53±0,44 ^a	12,55±0,34 ^a	13,21±0,25 ^a	17,08±0,76 ^a
P2	10,75 ±0,63 ^b	11,75±0,71 ^b	12,83±0,78 ^b	13,74±0,59 ^c	14,47±0,46 ^b	15,45±0,26 ^c	19,04±0,50 ^c
Taraf Nyata	***	***	***	***	***	***	***

Keterangan :

*** : Notasi yang berbeda menunjukkan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

Berdasarkan hasil pengamatan bahwa abnormalitas menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) pada semua jam. Abnormalitas mengalami peningkatan setiap jam, dipengaruhi oleh spermatogenesis dari ternak tersebut dan perlakuan semen setelah ejakulasi, seperti penanganan semen segar, pencampuran semen dengan pengencer dan pada saat pembuatan ulasan. Lamanya waktu penyimpanan juga mempengaruhi jumlah spermatozoa abnormal, seperti yang disampaikan Solihati dan Kune (2008) bahwa semakin lama waktu penyimpanan, maka persentase abnormalitas akan semakin tinggi. Pengencer P1(Tris Aminomethan+20% kuning telur) menunjukkan abnormalitas yang paling rendah, dibandingkan dengan CEP-2+10% kuning telur dan hasil yang paling tinggi pada Skim+10% kuning telur. Abnormalitas setelah pendinginan suhu 3-

5⁰C selama 24 jam masih dibawah 20%, sesuai dengan pendapat Parera, dkk. (2009) bahwa abnormalitas yang berpengaruh terhadap fertilitas jika lebih dari 25%.

Total Spermatozoa Motil pada Pendinginan Selama 24 Jam

Salah satu faktor keberhasilan IB yang paling sering dijadikan pedoman adalah motilitas, karena fertilitas juga ditentukan oleh jumlah spermatozoa motil yang bergerak progresif. Penentuan nilai harapan 40 juta spermatozoa motil/mililiter ditetapkan berdasarkan ketentuan SNI semen beku sapi, yaitu semen yang diinseminasikan memiliki konsentrasi spermatozoa 100 juta/ml dengan motilitas individu 40% (BSN, 2005). Total spermatozoa yang motil pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Total Spermatozoa Motil pada Pendinginan Jam ke 24

Perlakuan	Total Spermatozoa Motil (juta/ml)
P0	75,69 ± 19,24
P1	74,10 ± 14,92
P2	68,35 ± 14,82

Analisis menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40 juta spermatozoa motil menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) lebih tinggi pada semua perlakuan selama pendinginan 24 jam. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa jumlah spermatozoa motil lebih besar dari 40% (standar SNI), sehingga layak untuk diaplikasikan pada IB.

Nikbakht and Saharkhiz (2011), menjelaskan bahwa untuk mengetahui Total Motile Sperm Count (TMSC) dalam ejakulat yaitu mengalikan konsentrasi spermatozoa dengan persentase sperma motil progresif. Hasil terbaik dicapai bila jumlah TMSC melebihi ambang batas sekitar 10 juta/ml.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pengencer terbaik untuk mempertahankan kualitas semen Sapi Limousin yang disimpan pada suhu 3-5⁰C yaitu Tris Aminomethan + 20% kuning telur. Hasil rata-rata motilitas, viabilitas maupun abnormalitas paling baik berturut-turut yaitu (P1) Tris Aminomethan + 20% kuning telur, (P0) CEP-2 + 10% kuning telur dan (P3) Skim + 10% kuning telur. Persentase motilitas jam ke 24 terbaik berturut-turut yaitu pada pengencer Tris Aminomethan + 10% kuning telur, CEP-2+10% kuning telur dan Skim + 10% kuning telur.

Disarankan untuk melakukan penelitian dengan pengamatan waktu yang lebih lama untuk mengetahui berapa lama kemampuan pengencer dalam mempertahankan motilitas individu spermatozoa. Ketiga pengencer dapat digunakan sebagai semen cair dengan lama penyimpanan 24 jam pada suhu 3-5⁰C.

DAFTAR PUSTAKA

- Aminah, S. dan Z. Layla. 2001. Daya tahan hidup spermatozoa kambing dengan larutan pengencer tris, air kelapa, skim dan susu murni. *Buletin Teknik Pertanian*. 6(2).
- Arifiantini, RI. And TL. Yusuf. 2010. Developing of tris soy milk diluent for Frisian Holstein bull frozen semen. *Hayati Journal of Bioscience*. 17(2) : 91-94.
- BSN. 2005. Semen Beku Sapi. Badan Standarisasi Nasional. SNI 01-4869.1-2005. BSN. Jakarta.
- Ervandi., M., T. Susilawati, dan S. Wahyuningsih. 2013. Pengaruh pengencer yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa sapi hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur). *JITV* 18(3): 177-184.
- Garner, D. L., and E. S. E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma in Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams and Wikins, Philadelphia : 96-110.
- Nikbakht, R. And N. Saharkhiz. The Influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm samples on the success of intrauterine insemination. *International Journal of Fertility and Sterility*. Vol. 5 (3): 168-173.
- Parera, F., Z. Prihatini, D.F. Souhoka dan M. Rizal. 2009. Pemanfaatan sari wortel sebagai pengencer alternatif spermatozoa epididimis sapi bali. *J.Indon.Trop.Anim.Agric*. 34(1)
- Solihati, N dan P. Kune. 2008. Studi terhadap kualitas dan daya tahan hidup spermatozoa cauda epididimis domba Garut menggunakan berbagai jenis pengencer. *Seminar nasional teknologi peternakan dan veteriner 2008*.
- Suharyati, S., dan M. Hartono. 2011. Preservasi dan kriopreservasi semen sapi Limousin dalam berbagai bahan pengencer. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 5(2): 53-58.
- Susilawati, T. 2000. Analisa Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex G-200 dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Susilawati, T. 2002. Sexing spermatozoa kambing peranakan etawah menggunakan gradien putih telur. *Widya Agrika* 10(2): 97-105.

- Susilawati, T. 2011. Spermatologi. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.
- Toelihere, MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa : Bandung
- Verberckmoes, S., A. Van Soom, J. Dewulf., I. De Pauw, and A. de Kruif. 2004. Storage of fresh bovine semen in diluent based on the ionic composition of *Cauda Epididimal Plasma*. *J Reprod Domestic Anim.* 39(6): 1 – 7.
- Vishwanath, R., And P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen State. *Animal Reproduction Science* 62(2000) 23-53.