

Pengaruh Penambahan Tirosin Kinase dalam Pengencer Skim Kuning Telur dan Tris Kuning Telur Terhadap Persentase Motilitas dan Spermatozoa Hidup Sapi Friesian Holstein Post Thawing

The Effect Of Tyrosine Kinases Addition into The Egg Yolk Skim and Egg Yolk Tris Extender The Motility and Live Spermatozoa Percentages of The Holstein Friesian Post Thawing

¹Madyawati SP, ¹P Srianito, ²CP Dewi, ¹Ismudiono, ¹N Sianita

¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : spantja@yahoo.com

Abstract

The aim of this study is to determine the effects of the tyrosine kinase addition into the egg yolk skim and egg yolk tris extenders on the motility and live percentages of the thawed Holstein Friesian (FH) semen. This study used fresh Holstein Friesian semen collected using artificial vagina then this semen divided into four treatment groups. For the first group (P1) semen was diluted in egg yolk skim contained 100 ug / ml tyrosine kinase. For the second group (P2) semen was diluted in egg yolk skim extender contained 1,2% NaCl. For the third group (P3) semen was diluted in egg yolk tris extender contained 100 ug / ml tyrosine kinase. For the fourth group (P4) semen was diluted egg yolk tris extender with NaCl 1,2% (placebo). Semen from each group (P1-P4) were processed into frozen semen. After being thawed, the percentage of motile and live spermatozoa were calculated. Data was analyzed using Analysis of variance followed by Tukey test. In conclusion the addition of 48 ug tyrosine kinase in a very low concentration did not increase the percentage of motile and live spermatozoa of thawed semen.

Keywords : Motility, Live Spermatozoa, Holstein Friesian, Extender, Tyrosine Kinase

Pendahuluan

Salah satu cara yang dilakukan untuk meningkatkan populasi dan produktivitas ternak adalah melalui penerapan bioteknologi reproduksi yaitu inseminasi buatan (IB) (Rizal dan Herdis, 2008). Teknik IB adalah suatu teknologi mutakhir yang diciptakan manusia guna meningkatkan produktivitas dan reproduktivitas ternak untuk mengatasi tuntutan masyarakat dunia yang terus semakin meningkat jumlahnya dari tahun ke tahun (Hardijanto dkk., 2010). Penerapan bioteknologi IB pada ternak ditentukan oleh empat faktor utama, yaitu semen beku, ternak betina sebagai akseptor IB, keterampilan tenaga pelaksana (inseminator) dan pengetahuan zooteknis peternak.

Semen dapat disimpan dalam kondisi dingin (dalam *refrigerator*) atau dalam kondisi beku (dalam *nitrogen cair*). Semen hasil pendinginan (*chill semen*) mempunyai daya tahan relatif pendek, sedang bila disimpan dalam kondisi

beku memungkinkan penggunaan semen dalam jangka waktu yang lama (Suyadi, 2003).

Permasalahan utama dari semen beku adalah rendahnya kualitas semen setelah dilakukan *thawing*. Selama proses pembekuan terjadi penurunan motilitas yang disebabkan karena pengaruh pengencer atau kerusakan yang disebabkan oleh proses pembekuan (*cold shock*). Kematian spermatozoa selama pembekuan berkisar antara 20-80% dengan rata-rata 50 % (Hardijanto dkk., 2008). Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas tinggi dibutuhkan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat *thawing* (Toelihere, 1993).

Pengencer yang sering digunakan dewasa ini antara lain susu skim kuning telur dan tris kuning telur. Skim kuning telur merupakan pengencer dengan komposisi susu skim, aqua-

bides, kuning telur, antibiotika, glukosa dan gliserol. Sedangkan tris kuning telur merupakan pengencer dengan komposisi Tris amino methan, asam sitrat, laktosa, fruktosa, raffinosa, kuning telur, penicillin, streptomycin dan aquabides (Ditjennak, 2000).

Skim kuning telur merupakan pengencer organik yang mengandung bahan anti *cold shock* yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari ruang (28°C) pada saat pengolahan ke suhu ekuilibrase (5°C) (Arifanti dan Yusuf, 2004).

Pengencer tris kuning telur telah sangat umum digunakan dalam proses pembuatan semen beku berbagai jenis hewan. Pengencer Tris kuning telur tersusun atas : tris amino methan, asam sitrat, fruktosa, kuning telur, antibiotik, gliserol dan aquabides. Tris amino methan merupakan *buffer* dan dapat mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Asam sitrat selain juga berfungsi sebagai *buffer* mempunyai fungsi untuk mendispersikan butir-butir lemak kuning telur. Fruktosa berfungsi menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Kuning telur mempunyai fungsi selain sebagai *buffer* dan sumber energi juga sebagai krioprotektan. Antibiotik berfungsi untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme, sedangkan gliserol untuk melindungi sperma terhadap efek *lethal* pada saat pembekuan (Ditjennak, 2000).

Tirosin kinase termasuk dalam kelompok protein yang salah satu fungsinya adalah menstabilkan ikatan kovalen penyusun protein membran sehingga bila disuplementasikan ke dalam medium pengencer diharapkan dapat mencegah putusannya ikatan kovalen membran spermatozoa. Selanjutnya suplementasi tirosin kinase dapat menginduksi aktivitas tirosin kinase endogen melalui pengikatan dengan reseptor tirosin kinase yang berada di membran plasma spermatozoa kemudian akan mengaktifkan signal transduksi sampai terjadi proses fosforilasi tirosin kinase yang dapat menyebabkan hiperaktivitas dan peningkatan motilitas spermatozoa. Suplementasi tirosin kinase kedalam medium pengencer semen beku diharapkan dapat memperbaiki kualitas spermatozoa sapi perah *post thawing* (Madyawati, 2007).

Materi dan Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan alat vagina buatan, tabung penampungan semen, tabung reaksi,

aluminium foil, termometer, pengaduk kaca, gelas beaker, tabung erlenmeyer, mikropipet, gelas ukur, *colony counter*, gelas obyek dan penutup, kertas tissue, mikroskop, *cool top*, container nitrogen cair, lemari ultra violet, korek api, pembakar Bunsen, tabung ependorf, inkubator, gunting, kertas Ph, *water bath*, timbangan analitik, thermometer, gunting, straw, spektrofotometer dan *filling and sealing machine*.

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian kali ini adalah semen sapi Friesian Holstein. Bahan lain yang digunakan adalah pengencer skim kuning telur; pengencer TRIS kuning telur ; Tirosin Kinase ($1600\text{ }\mu\text{g/ml}$) (yang didapatkan dari Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang), nitrogen cair, NaCl fisiologis, pewarna eosin negrosin, alkohol 70%.

Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian antara lain, pembuatan semen beku tipe straw yaitu : pembuatan bahan pengencer, penampungan semen, pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen, proses pengenceran, proses pembekuan semen, kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa dan pemeriksaan spermatozoa hidup *post thawing*.

Penelitian terbagi atas empat perlakuan : (1) Perlakuan 1 (P1) terdiri dari semen ditambah pengencer skim kuning telur yang ditambah tirosin kinase $100\text{ }\mu\text{g/ml}$; (2) Perlakuan 2 (P2) terdiri dari semen ditambah pengencer skim kuning telur yang ditambah placebo (NaCl 1,2%); (3) Perlakuan 3 (P3) terdiri dari semen ditambah pengencer tris kuning telur yang ditambah tirosin kinase $100\text{ }\mu\text{g/ml}$; (4) Perlakuan 4 (P4) terdiri dari semen ditambah pengencer tris kuning telur yang ditambah placebo (NaCl 1,2%).

Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan empat perlakuan dan enam kali ulangan. Dengan t adalah perlakuan dan n adalah ulangan. Data yang diperoleh disusun dalam satu tabel, selanjutnya perbedaan viabilitas dilakukan uji ANAVA (Kusriningrum, 2008).

Tabel 1. Rataan dan Simpangan Baku Persentase Motilitas Progresif Spermatozoa *Post Thawing* Semen Sapi FH

Perlakuan	Ulangan(n)	Motilitas Spermatozoa (%)	Kecepatan Gerak Individu Spermatozoa
P1	6	37,50 ^b ± 4,18	2
P2	6	44,17 ^a ± 2,04	3
P3	6	28,33 ^c ± 4,08	2
P4	6	41,67 ^{ab} ± 2,58	3

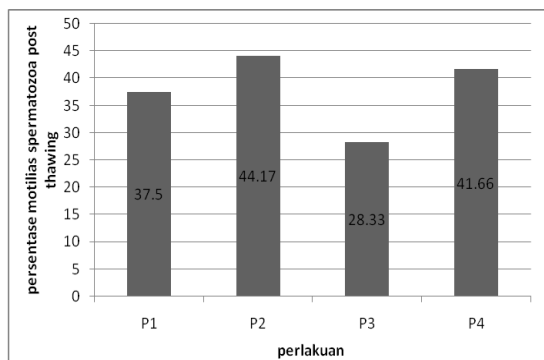
Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$).

Hasil dan Pembahasan

Persentase motilitas progresif spermatozoa *post thawing*

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0.05$) antar perlakuan terhadap motilitas spermatozoa setelah pembekuan.

Berdasarkan tabel di atas, diagram rata-rata persentase motilitas spermatozoa *post thawing* dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 1. Grafik Persentase Motilitas Spermatozoa Friesian Holstein *post thawing*

Pada Gambar 1. terlihat bahwa persentase motilitas spermatozoa *post thawing* terbaik terdapat pada P2 kemudian persentase motilitas spermatozoa yang lebih rendah pada P4 dan P1. Persentase motilitas spermatozoa *post thawing* terendah terdapat pada P3.

Penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan tirosin kinase memberikan persentase motilitas spermatozoa yang rendah pada semen beku *post thawing*. Hal ini berbeda dengan penelitian Madyawati (2007) yang membuktikan bahwa penambahan tirosin kinase pada dosis 100 µg /ml ke dalam medium pengencer semen beku

skim kuning telur sudah dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, persentase spermatozoa hidup dan presentase integritas membran sebelum dan sesudah pembekuan. Hal ini dikarenakan pada penelitian Madyawati (2007) didapatkan total konsentrasi tirosin kinase yang tinggi (20030 µg/ml) sehingga pada konsentrasi tersebut tirosin kinase yang ditambahkan dalam medium pengencer semen beku dapat menstabilkan ikatan kovalen penyusun protein membran spermatozoa. Stabilitasnya ikatan kovalen, dapat mencegah putusannya ikatan kovalen protein membran plasma. Sedangkan pada penelitian ini hanya tersedia tirosin kinase dengan konsentrasi rendah (1600 µg/ml), menyebabkan penambahan tirosin kinase harus diberikan dengan volume yang tinggi sebanyak 480 µl ke dalam 8 ml pengencer semen. Hal ini menyebabkan banyak bahan pengencer dari tirosin kinase yang ikut tercampur dalam pembuatan semen beku. Selain itu, rendahnya konsentrasi tirosin kinase diduga membuat sifat tirosin kinase menjadi hipotonis sehingga menyebabkan destabilisasi membran yang selanjutnya akan berpengaruh pada putusannya ikatan kovalen protein membran spermatozoa. Membran spermatozoa yang tidak stabil akan menyebabkan transportasi cairan yang keluar maupun yang masuk pada spermatozoa menjadi tidak sempurna. Hal ini bisa menyebabkan terjadinya kerusakan membran spermatozoa dan menyebabkan kematian spermatozoa. Kematian spermatozoa ini membuat persentase motilitas menjadi rendah.

Persentase spermatozoa hidup *post thawing*

Hasil pemeriksaan persentase hidup spermatozoa setelah diberi perlakuan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0.05$) antar perlakuan terhadap viabilitas spermatozoa setelah pembekuan.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa persentase hidup spermatozoa *post thawing* terbaik terdapat pada P2 kemudian persentase hidup spermatozoa yang lebih rendah pada P4 dan P1. Persentase

Tabel 2. Rataan dan Simpangan Baku Persentase Spermatozoa Hidup *Post Thawing* Semen Sapi FH

Perlakuan	Ulangan (n)	Spermatozoa Hidup (%) (rerata $\pm$ standar deviasi)
P1	6	47,67 ^b $\pm$ 8,47
P2	6	59,83 ^a $\pm$ 4,07
P3	6	38,00 ^b $\pm$ 5,4
P4	6	59,00 ^a $\pm$ 5,67

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$).

hidup spermatozoa *post thawing* terendah terdapat pada P3.

Fungsi protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa antara lain adalah sebagai reseptor, antigen, signal transduksi dan stabilisasi ikatan kovalen penyusun protein membran plasma. Pada proses pembekuan akan menyebabkan lemahnya ikatan kovalen penyusun protein membran plasma, membran mitokondria maupun komponen penyusun yang lain. Melemahnya ikatan kovalen yang terjadi akan diikuti dengan putusannya ikatan tersebut, jika sel spermatozoa terpapar pada suhu yang rendah dalam waktu yang lama. Hal ini akan menyebabkan komposisi penyusun membran spermatozoa dan akan mengakibatkan penurunan fungsi dan destabilisasi membran (Rubinsky, 2000).

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa penambahan tirosin kinase dengan konsentrasi rendah dengan volume yang tinggi sebanyak 480 μ l kedalam pengencer skim kuning telur dan tris kuning telur sebanyak 8 ml tidak memberi pengaruh terhadap peningkatan persentase motilitas dan spermatozoa hidup sapi *Friesian Holstein post thawing*.

Daftar Pustaka

- Arifiantini, R.I. dan T.L. Yusuf. 2004. Keberhasilan Penggunaan Tiga Pengencer dalam Dua Jenis Kemasan pada Proses Pembekuan Semen Sapi Friesian holstein. <http://www.google.com>. [30 mei 2010].
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2007. Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2000. Prosedur Tetap (PROTAP) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Produksi Peternakan. Jakarta. 29 – 47.
- Hardijanto, S. dan Hardjopranto. 1994. Ilmu Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal : 47 – 51.
- Hardijanto T, T.Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati dan T.W.Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Kusriningrum. 2008. Dasar Perancangan Percobaan. Dani Abadi. Surabaya.
- Madyawati, S.P. 2007. Suplementasi Tirosin Kinase Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (FH) Terhadap Kualitas Semen Beku [Desertasi]. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Rizal, M dan Herdis. 2008. Inseminasi Buatan Pada Domba. Rineka Cipta. Jakarta.
- Rubinsky, B. 2000. Cryosurgery. Annual Review in Biomedical Engineering. University of California at Berkeley. Berkeley.
- Suyadi. 2003. Pengenceran Semen Kambing Dengan Beberapa Pengencer Sederhana dan Aplikasinya Untuk Inseminasi Buatan. Penerbit Simetrika22. Malang.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung. Hal. 45-48, 95-100.
- Toelihere, M.R. 1997. Peranan Bioteknologi Reproduksi Dalam Pembinaan Produksi Peternakan di Indonesia. Disampaikan pada Pertemuan Teknis dan Koordinasi Produksi (PERTEKSI) Peternak Nasional T.A. 1997/1998, Ditjennak di Cisarua-Bogor 4-6 Agustus 1997.