

Motilitas, Persentase Hidup dan Keutuhan Membran Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Post Thawing dalam Tiga Macam Diluter**Motility, Live Percentage and Completeness Of Post Thawing Thick Tail Sheep Membrane Spermatozoa in Three Variance Diluter****¹Pudji Sriananto, ²Nancy Dahnia, ¹Abdul Samik, ¹Herman Setyono**¹ Fakultas Kedokteran Hewan Unair² Fakultas Kedokteran Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : psriananto@yahoo.com

Abstract

The aims of this research to know about the effect of three variances diluter in sustaining motility, live percentage, and completeness of post thawing thick tail sheep membrane (DEG) spermatozoa. This research uses frozen semen sample of EG sheep in the straw form then divided into 3 treatments namely yolk skim (P1), yolk tris (P2) and AndroMed[®]. After be thawing then performed quality examination included motility, live percentage, and completeness of membrane spermatozoa plasma. Data processed by using ANOVA (Analysis Of Variance) and followed with Tukey Test. The result of motility gained there is no found real difference among diluter ($p > 0.05$), while live percentage and completeness of membrane spermatozoa indicating very real differences among diluter ($p < 0.01$). Based on data taken from this research in motility, live percentage, and the best completeness of membrane spermatozoa taken from diluter AndroMed[®].

Keywords : thick tail sheep, sperm diluter, frozen semen, sperm motility**Pendahuluan**

Kebutuhan akan daging saat ini sangat mendesak, untuk itu perlu upaya pemanfaatan ternak semaksimal mungkin. Ternak domba merupakan salah satu jenis ternak yang dapat dimanfaatkan dalam memenuhi kebutuhan daging. Memiliki potensi pengembangan yang cukup besar, mudah dikembangkan, sistem pemeliharaan yang relatif mudah, siklus reproduksi singkat, dan domba merupakan ternak yang lebih tahan terhadap berbagai jenis penyakit dibandingkan ternak lainnya (Almahdy *et al.*, 2000).

Salah satu cara yang dilakukan untuk meningkatkan produktifitas ternak adalah melalui penerapan bioteknologi reproduksi yaitu Inseminasi Buatan (Rizal dan Herdis, 2008). Teknik Inseminasi Buatan (IB) adalah suatu teknologi yang diciptakan manusia guna meningkatkan produktivitas dan reproduktivitas

ternak untuk mengatasi kebutuhan daging masyarakat dunia yang terus semakin meningkat jumlahnya (Hardijanto dkk., 2010).

Proses inseminasi buatan memerlukan kualitas dan kuantitas semen yang baik, untuk itu diperlukanya bahan diluter guna mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses penyimpanan. Kualitas semen akan menurun jika penyimpanan tidak ditambahkan dengan bahan diluter. Karena semen yang tidak diencerkan akan sukar mempertahankan hidupnya lebih dari 24 jam, walaupun disimpan dalam suhu yang rendah (Hafez and Hafez, 2000)

Semen segar yang baru ditampung dan sudah dinilai, sesegera mungkin diencerkan dengan bahan diluter yang sesuai (Hafez dan Hafez, 2000). Tujuan dari pengenceran semen untuk meningkatkan volume semen dan dapat disimpan lama tanpa mengurangi kesuburannya (Hardijanto dkk., 2007). Agar diperoleh semen

beku yang berkualitas baik dibutuhkan bahan diluter yang memenuhi syarat untuk inseminasi buatan. Syarat diluter yang baik adalah melindungi spermatozoa dari *cold shock* (kejutan dingin) pada suhu rendah serta mengandung bahan nutrisi, antibiotik, dan *buffer* (Toelihere, 1993).

Pemilihan jenis diluter yang tepat juga merupakan salah satu komponen utama pada proses pembekuan. Diluter yang telah umum digunakan dalam proses kriopreservasi semen adalah diluter susu skim dan tris biasanya juga ditambahkan kuning telur. Selain itu beberapa perusahaan telah memproduksi diluter semen komersial siap pakai seperti: Biladyl, Triladyl dan AndroMed® (Minitub Jerman) yang menggunakan ekstrak kacang kedelai dengan target utama *lesitin* yang terkandung didalamnya sebagai pengganti kuning telur (Rizal dkk., 2004). Seperti diketahui bahwa jenis diluter semen sangat bervariasi dan masing-masing memiliki keistimewaan (Paulenz *et al.*, 2002), serta tidak semua bahan diluter memperlihatkan kemampuan yang sama baik dalam mempertahankan spermatozoa (Solihati dan Kune, 2004).

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Semen Beku Taman Ternak Pendidikan (*Teaching Farm*) didesa Tanjung kecamatan Kedamean, kabupaten Gresik dan Laboratorium *Invitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai dengan November 2011.

Penelitian ini menggunakan sampel semen domba EG, yang semennya dapat diproses menjadi semen beku di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga. Domba Ekor Gemuk jantan berjumlah satu ekor, berumur ± 4 tahun, mempunyai berat badan sekitar ± 50 kg, diameter testis berukuran 28 cm, secara klinis dinyatakan sehat dan mempunyai libido yang baik.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan lengkap dengan tabung penampung berskala, satu unit kontainer N₂ cair, spektrofotometer, *water bath*, *cool top*, *thermometer* 100°C, gunting, *erlenmeyer*, spuit tuberkulin 1 ml, pipet pasteur, straw (warna kuning), tabung kuvet, petridis, alat penghitung, pemanas bunsen, kertas indikator pH, kertas *alluminium foil*, gelas

objek, gelas penutup, mikropipet, *filling and sealing machine*, inkubator CO₂, dan mikroskop cahaya.

Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa Post Thawing

Pada pemeriksaan PTM (*Post Thawing Motility*) segera dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop 400x yaitu dengan melihat berapa besar persentase motilitas progresif setelah pembekuan. Tahap pertama semen yang telah di *thawing* (dengan cara dimasukkan ke dalam *water bath* yang bersuhu 37-38°C selama 15 detik), lalu gunting pada bagian ujung straw, kemudian teteskan ke gelas objek yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alkohol 70% (Dirjenak, 2007). Setelah itu tutup dengan gelas penutup dan diamati motilitas spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Bangsa domba standart minimal PTM (progresif) 30% dengan gerakan kecepatan individu spermatozoa 2 ditulis 30/2 dan gerakan massa ++ (Dirjenak, 2000).

Pemeriksaan Persentase Hidup (Viabilitas) Spermatozoa Post Thawing

Pemeriksaan evaluasi kualitas semen salah satunya ditentukan oleh persentase spermatozoa yang hidup dan mati. Pada pemeriksaan persentase hidup yaitu dengan cara pewarnaan membuat preparat ulas. Sebelum evaluasi dilakukan siapkan 4-5 buah objek glass kering dan steril, larutan eosin negrosin dan pembakar bunsen (Yuyun, 1996).

Semen yang telah di *thawing* ditetaskan pada bagian ujung gelas objek, kemudian teteskan zat warna lalu campur sampai homogen. Gelas penutup, ditempelkan pada bagian ujung dari campuran semen, kemudian dengan posisi miring bersudut lancip 45° dorong sepanjang gelas objek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen setipis mungkin yang telah diwarnai. Selanjutnya langsung diletakkan di atas permukaan api bunsen beberapa detik sampai kering. Evaluasi perhitungan dilakukan di bawah mikroskop pembesaran 400x. Pemeriksaan dilakukan minimal 5 lapang pandang berbeda, kemudian tahap akhir baru dihitung persentase hidup spermatozoa (Dirjenak, 2000).

Pemeriksaan Keutuhan (Integritas) Membran Plasma Spermatozoa

Semen yang telah di *thawing* dituang dalam wadah petridis steril, dengan takaran perbandingan 1:9 semen dengan larutan HOS (Lampiran 7), lalu diinkubasi selama ± 1 jam didalam inkubator CO₂ pada suhu 37°C.

Kemudian dibuat preparat ulas tipis dengan meneteskan zat warna eosin negrosin dan evaluasi dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Spermatozoa dengan keutuhan membran plasma yang baik dapat memperlihatkan adanya perubahan-perubahan morfologik. Dicirikan oleh adanya pembengkakan pada ujung ekor, lengkungan pada ekor, ekor yang pendek dan tebal, serta terjadi pembengkakan pada sebagian atau seluruh bagian dari lengkungan yang dibentuk oleh ekor spermatozoa (Feradis, 2010).

Dalam penelitian ini ada tiga perlakuan. Perlakuan tersebut adalah :

1. Perlakuan 1 (P1) terdiri dari semen domba EG ditambah diluter skim kuning telur.
2. Perlakuan 2 (P2) terdiri dari semen domba EG ditambah diluter tris kuning telur.
3. Perlakuan 3 (P3) terdiri dari semen domba EG ditambah diluter AndroMed®.

Analisis Data

Rancangan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam ulangan. Penentuan ulangan berdasarkan rumus $t(n-1) \geq 15$. Data dianalisis menggunakan ANOVA yang akan dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) dengan taraf signifikan 5% (Kusriningrum, 2009).

Hasil Dan Pembahasan

Motilitas Spermatozoa Domba EG Post Thawing

Pemeriksaan awal secara makroskopis dan mikroskopis semen dinyatakan layak untuk diproses menjadi semen beku. Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa setelah diberi perlakuan menunjukkan angka rata-rata dan standar deviasi secara berturut-turut adalah P1 sebesar $35,00 \pm 8,36$, P2 sebesar $40,00 \pm 6,32$, dan P3 sebesar $45,00 \pm 8,36$. (Tabel 1).

Tabel 1 Rerata dan Standar Deviasi Motilitas Spermatozoa Domba EG Post Thawing

Perlakuan	Motilitas % ($X \pm SD$)
P1	$35,00^a \pm 8,36$
P2	$40,00^a \pm 6,32$
P3	$45,00^a \pm 8,36$

Superskrip dengan notasi yang sama menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$).

Ternyata ketiganya memberikan motilitas yang baik. Hal ini disebabkan karena masing-masing kandungan yang dimiliki bahan diluter secara umum memenuhi syarat dan sesuai dengan yang dibutuhkan spermatozoa agar dapat bertahan hidup. Seperti yang disebutkan oleh Hardijanto dkk (2010), tentang syarat bahan diluter harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, bahan anti *cold shock*, antibiotik, dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan dan *thawing*. Diperlukan diluter yang mampu mempertahankan spermatozoa dari kematian akibat terjadi penurunan suhu pada proses pembekuan dan hal itu terdapat dalam diluter yang mengandung kuning telur.

Adanya kuning telur yang terdapat didalam diluter skim kuning telur dan tris kuning telur berfungsi dapat mencegah kejutan dingin (*cold shock*) karena adanya *lecitine* dan *lipoprotein* yang dapat bekerja sebagai lapisan pelindung (*protecting layer*) sehingga dapat melindungi spermatozoa dari gangguan luar. Sebagai pengganti kuning telur pada pengencer AndroMed® digunakan ekstrak kedelai dengan target utama *lesitin* yang terkandung di dalamnya (Rizal dan Herdis, 2008). Pada dasarnya Masing-masing komposisi penyusun bahan diluter mempunyai fungsi yang berguna untuk kelangsungan hidup terutama motilitas atau daya gerak spermatozoa (Feradis, 2010).

Persentase Hidup (Viabilitas) Spermatozoa Domba EG Post Thawing

Pemeriksaan persentase hidup spermatozoa menggunakan preparat ulas dengan pewarnaan eosin negrosin. Berdasarkan uji Anova (Lampiran 11) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antar diluter ($p < 0.01$) terhadap persentase hidup spermatozoa *post thawing*. Untuk mengetahui

perbedaan persentase hidup spermatozoa maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

Tabel 2 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Hidup Spermatozoa Domba EG *Post Thawing*

Perlakuan	Spermatozoa Hidup (%) ($\bar{X} \pm SD$)
P1	44,83 ^a $\pm$ 5,94
P2	50,50 ^{ab} $\pm$ 6,12
P3	57,66 ^b $\pm$ 5,78

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0.01$).

Pada spermatozoa yang hidup, zat warna yang masuk akan dipompa kembali keluar sehingga spermatozoa terlihat berwarna putih atau jernih. Pada spermatozoa yang mati, kemampuan daya pompa dari sel sudah tidak berfungsi dengan baik sehingga zat warna tetap berada di dalam sel, dan sel spermatozoa terlihat berwarna merah (Herdis dkk., 2008). Hal ini juga diduga karena pada bagian kepala spermatozoa dibungkus oleh sel membran, apabila spermatozoa mati permeabilitas membran akan meningkat terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan spermatozoa hidup dan mati (Toelihere, 1993).

Persentase hidup spermatozoa pada Tabel 2 menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan persentase motilitas pada Tabel 1. Sesuai dengan pendapat Partodiardjo (1992), bahwa spermatozoa yang hidup belum tentu motil, sedangkan spermatozoa yang motil pasti hidup. Hal ini dikarenakan banyaknya spermatozoa yang masih hidup tetapi tidak motil atau tidak bergerak progresif sehingga persentase hidup spermatozoa selalu lebih tinggi dari pada persentase motilitas (Kostaman dan Sutana, 2006).

Keutuhan (Integritas) Membran Plasma Spermatozoa Domba EG

Berdasarkan uji Anova (Lampiran 11) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antar diluter ($p < 0.01$) terhadap keutuhan membran spermatozoa *post thawing*. Untuk mengetahui perbedaan keutuhan membran spermatozoa maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

Tabel 3 Rerata dan Standar Deviasi Keutuhan Membran Spermatozoa Domba EG Setelah Diinkubasi Selama ± 1 Jam :

Perlakuan	Keutuhan Membran (%) ($\bar{X} \pm SD$)
P1	20,50 ^a $\pm$ 4,183
P2	22,66 ^{ab} $\pm$ 3,076
P3	29,50 ^c $\pm$ 3,209

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata ($p < 0.01$).

Hypo-Osmotic Swelling Test merupakan tes sederhana yang digunakan untuk mengukur fungsi apakah membran plasma masih aktif atau tidak serta dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan fertilisasi (Sarmardzija, 2008). Keutuhan membran spermatozoa yang utuh akan terlihat bagian ekor melengkung serta mengalami pembengkakan karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi baik dalam menyerap cairan pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Dan keutuhan membran spermatozoa yang rusak ekor tidak akan melengkung atau lurus serta tidak mengalami pembengkakan disebabkan karena permeabilitasnya menurun, sehingga larutan *hypoosmotic* dapat keluar masuk membran spermatozoa dengan bebas menyebabkan ekor kembali lurus (Susilowati, 2008).

Membran yang masih utuh menghasilkan persentase hidup lebih baik dalam bahan diluter AndroMed® (Aisen, 2002). Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), karbohidrat yang terkandung dalam AndroMed® merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler dan berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Membran plasma sel yang tetap utuh akan memberikan pengaruh positif terhadap motilitas (gerak progresif) dan persentase hidup (viabilitas) spermatozoa sehingga akan mempengaruhi angka fertilisasi.

Menurut Rizal dan Herdis (2008), keutuhan membran plasma sangat berkorelasi dengan viabilitas spermatozoa, apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan kehilangan motilitasnya dan mengakibatkan kematian.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa Penggunaan diluter skim kuning telur, tris kuning telur dan AndroMed® dapat mempertahankan motilitas, persentase hidup, dan keutuhan membran plasma spermatozoa domba ekor gemuk (DEG).

Daftar Pustaka

- Aisen E.G., V.H Mediana and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*. 57 : 1801-1808.
- Almahdy H., M. W. Tess, E. E.I. Tawil, E. Shehata and H. Mansour. 2000. Evaluation of egyptian sheep production system: I. Breed crosses and management systems. *J. Anim Sci*. 78:283-287.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2000. Prosedur Tetap (PROTAP) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta. P:40-47.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak. Alfabeta. Bandung.
- Hafez E.S.E and B. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animal, 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. South Carolina. USA. p:347-441.
- Hardijanto., T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati dan T.W. Suprayogi. 2007. Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (IB). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardijanto., T. Sardjito, T. Hernawati, S. Susilowati dan T.W. Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Herdis. M. Suracchman, Yulnawati, M. Rizal, dan H. Maheswari. 2008. Viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan maltose dalam pengencer. Bogor.
- Kostaman T. dan I.K. Utama. 2006. Studi Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Boer pada Pengencer Tris-Sitrat-Fruktosa. *Jurnal Sain Veteriner*. Volume 24.
- Kusriningrum R.S. 2009. Buku Ajar Perancangan Percobaan. Cetakan kedua. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penerbit Dani Abadi. Surabaya.
- Partodiharjo S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Edisi Ketiga. Penerbit Mutiara. Jakarta. 530-560.
- Paulenz H., L. Soderquist, R. Perez-Pe and K.A. Berg. 2002. Effect of diffent extender and storage temperatures o sperm viability of liquid ram semen *.Theriogenology* 57 (2): 823-836.
- Rizal M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2004. Pengaruh waktu penyimpanan epididimis pada suhu 5 °C terhadap kualitas spermatozoa epididimis domba garut. *J. Veteriner* 5:95-103.
- Rizal M. dan Herdis 2008. Inseminasi Buatan Pada Domba. Penerbit Rineka Cipta.
- Samardzija M., Tomislav D., Suzana K., Marijan C., Martina K., Nikica P., and Jurac G. 2008. The Use Of The Hypoosmotic Swelling Test And Supravital Staining In Evaluation Of Sperm Quality In Boars. *Veterinarski Arhiv* 78 (4), 279-287.
- Solihati N. dan P. Kune. 2004. Pengaruh jenis Pengencer terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simmental. Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran. Bandung. 2-3.
- Supriatna, I. Dan F.H Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Susilowati S. 2008. Komplek Insulin Like Growth Faktor-I Mempengaruhi Presentase Membran Plasma Utuh Dan Kadar Malondialdehid Spermatozoa. *Jurnal Veteriner* Desember 2008 VOL 9 No. 4 : 168-179.
- Toelihere M. R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak Cetakan III. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Yuyun. 1996. Motilitas dan Persentase Hidup Spermatozoa Semen Sapi FH dalam

Pudji Srianto dkk. Motilitas, Persentase Hidup dan ...

Larutan Lugol. Skripsi. Fakultas Peter-
nakan. Universitas Brawijaya. Malang.