

Viabilitas Spermatozoa Semen Beku Babi *Duroc* Dalam Extender *Beltsville Thawing Solution* Menggunakan Krioprotektan Gliserol Dan Dimetilacetamida

(The Spermatozoa Viability From Boar Landrace Frozen Semen In Beltsville Thawing Solution Extender Using Glycerol And Dimethylacetamide As Cryoprotectant)

Nancy Diana Frederika Katerina Foeh^{1*}, Raden Iis Arifiantini², Tuty Laswardy Yusuf³

¹Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana, Penfui, Kupang 85001

^{2,3}Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat 16680

*korespondensi: Nancy_vet04@yahoo.co.id

ABSTRACT

This study investigated the effect of glycerol and dimethylacetamide (DMA) in beltsville thawing solution (BTS) extender. Semen samples were collected from three boars of the Duroc breed (n=5) and were evaluated microscopically and macroscopically. Semen that have been evaluated and meets the following criteria: has motility characteristics >70%, concentration >300 million/ml and abnormality 20%; was accepted as appropriate samples. Semen samples were divided into four tubes and were diluted with 5 ml of BTS. The diluted semen was left for two hours in the temperature range from 20 to 22 °C before was centrifuged for 15 minutes (500G). The pellet of centrifuged semen was taken as much as 1 ml with its supernatant. The BTS glycerol (BTS_G), BTS-DMA (BTS_D), BTS-Glycerol-DMA (BTS_{G-D}) were added into the pellet. The diluted semen was packed into straw of 0.5 ml and was equilibrated for 2 hours in 4 °C. The equilibrated semen was frost with the steam of nitrogen and stored in liquid nitrogen. The quality of frozen semen was assessed at least 24 hour after freezing process. The results indicate that the sperm motility after thawing in BTS extender BTS_D is 52.14±0.4%, higher than the other two extenders (P<0.05). Thus, it is conclude that the DMA concentration in BTS extender maintains the quality of frozen semen from the Duroc breed better than other extenders.

Keywords : BTS, gliserol, DMA, boar

PENDAHULUAN

Pembekuan semen babi mempunyai peranan penting dalam industri peternakan babi, selain dapat memperoleh genetik yang unggul, juga

dapat meningkatkan efisiensi biosecurity dan peningkatan produksi daging khususnya daging babi. Semen babi mengandung spermatozoa yang mempunyai komposisi membran plasma

yang berbeda jika dibanding ternak lainnya yaitu memiliki *phosphatidylethanolamine* dan *sphingomyelin* sangat tinggi hingga mencapai 24% dan 14%., sehingga mudah mengalami *cold shock* saat proses preservasi, menurut Paulenz *et al.*(2000) untuk mengurangi efek *cold shock* akibat preservasi ini dilakukan *holding time* pada suhu ruang (20-22 °C) agar spermatozoa dapat beradaptasi pada saat preservasi dan kriopreservasi. Preservasi semen cair babi hanya bisa dilakukan pada suhu 20-22 °C.

Menurut Aboagla dan Terada (2004) untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas beberapa hal yang perlu diperhatikan adalah teknik yang tepat dalam pembekuan semen, jenis dan konsentrasi krioprotektan yang ditambahkan dan bahan pengencer yang digunakan.

Penentuan bahan pengencer yang tepat menentukan kualitas spermatozoa. Pengencer *Beltsville Thawing Solution* (BTS[®]) merupakan bahan pengencer berdaya simpan singkat 1-3 hari (Gadea 2003). Penambahan kuning telur dalam bahan pengencer diatas sangat dibutuhkan untuk melindungi

spermatozoa dari *cold shock* pada saat preservasi maupun kriopreservasi.

Kriopreservasi semen juga membutuhkan penambahan krioprotektan yang tepat baik jenis maupun jumlah dalam medium pengencer dengan tujuan melindungi spermatozoa dari *cold shock*. Menurut Leboeuf *et al.* (2000) gliserol merupakan krioprotektan intraseluler, gugus hidroksil -OH akan berikatan dengan molekul H₂O sehingga mengambat terbentuknya kristal es, krioprotektan ini juga dapat berikatan dengan gugus pusat fosfolipid pada membran sehingga mengurangi ketidakstabilan pada membran sel selama proses pembekuan. Penambahan krioprotektan golongan amida seperti *dimethylacetamide* (DMA) dapat menunjukkan potensi yang lebih baik karena memiliki berat molekul yang lebih rendah (87.12 kd) jika dibandingkan dengan gliserol (92.05 kd). Semakin rendah berat molekul, semakin cepat menembus membran sehingga mengurangi toksisitas yang diakibatkan oleh osmolatitas yang tinggi. Oleh sebab itu tujuan dari penelitian ini dilakukan mendapatkan krioprotektan yang tepat dalam bahan pengencer BTS[®].

METODE DAN METODE

Sumber Semen

Semen segar berasal dari lima ekor babi *Duroc* jantan yang telah mengalami dewasa kelamin berumur 1-3 tahun. Babi dipelihara dalam kandang individual dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan diberikan sebanyak 3 kg/ekor/hari dalam bentuk konsentrat dan air minum yang diberikan secara *ad libitum*.

Penyiapan Bahan Pengencer Dasar

Bahan pengencer dasar yang digunakan adalah pengencer komersial BTS[®] (Minitub Germany) dengan proses pengenceran sebagai berikut: 50g BTS[®] diencerkan dengan aquadest steril secara perlahan hingga mencapai 1000 ml dan selanjutnya pengencer disimpan pada suhu 37°C.

Penyiapan Bahan Pengencer Semen Beku

Pembuatan pengencer semen beku dengan cara: pengencer dasar 80% ditambahkan 20% kuning telur dan disentrifius dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan BTS

selanjutnya diambil dan dijadikan pengencer semen beku dengan 3 kombinasi perlakuan semen beku untuk babi yang terdiri atas BTS gliserol (BTS-G), BTS-DMA (BTS-D), BTS-Gliserol-DMA (BTS-GD).

Koleksi Semen

Penampungan semen dengan metode *glove hand method* menggunakan *dummy sow*. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari dengan periode pengambilan dua kali dalam seminggu. Fraksi gelatin disaring dengan menggunakan kain kasa pada atas tabung penampungan.

Evaluasi Semen

Semen hasil koleksi dievaluasi secara makros dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi :

1. Volume semen (ml). Pengukuran volume dapat diukur dengan melihat skala pada gelas ukur, volume normal semen segar 100-500 ml.

2. Warna. Warna semen segar dilihat secara visual, warna normal semen segar putih susu.
3. Derajat keasamaan (pH). Pengukuran pH dapat diukur dengan menggunakan pH meter, untuk memperoleh data yang akurat, melakukan kalibrasi sebelum alat tersebut digunakan. pH normal semen segar babi berkisar 6.8-7.6 .
4. Konsistensi. Konsistensi atau derajat kekentalan, Cara menilai konsistensi adalah dengan memiringkan tabung yang berisi semen dan mengembalikan pada posisi semula. konsistensi normal semen segar babi adalah encer.

Evaluasi mikroskopis meliputi :

1. Motilitas spermatozoa. Persentase Motilitas spermatozoa hitung dengan cara meneteskan semen dan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1:1, dihomogenkan dan ditutup dengan *cover glass* setelah itu diamati dibawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 10x40. Persentase motilitas dinilai secara subjektif kuantitatif dengan membandingkan spermatozoa bergerak maju ke depan (*progresif*) dan yang tidak progresif. Penilaian diberikan dari angka 0%

(tidak *motil*) sampai 100% (*motil* semua).

2. Konsentrasi spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *Neubauer Chamber* dengan pengenceran (10 μ L dalam 990 μ L dalam *formolsaline* atau *eosin 2%*).
3. Viabilitas spermatozoa. Persentase viabilitas dihitung menggunakan zat pewarna *eosin-nigrosin*. Pemeriksaan dilakukan dibawah mikroskop. Spermatozoa dihitung minimal 200 sel dari 10 lapang pandang. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna (transparan) dan yang mati akan menyerap warna merah pada bagian kepala.
4. Morfologi spermatozoa. Morfologi spermatozoa dievaluasi dengan pewarnaan *carbofucshin*, dibuat preparat ulas semen segar dan pewarnaan dilakukan sesuai Arifiantini *et al.*(2012) dilanjutkan dengan pemeriksaan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x40.

Semen yang memiliki motilitas >75% dengan konsentrasi >200x10⁶ sel/ml dengan abnormalitas <20%, yang digunakan dalam pembekuan semen beku.

Pengenceran dan Pembekuan Semen

Semen hasil koleksi dibagi ke dalam tiga tabung, setelah itu ditambahkan dengan dengan pengencer BTS[®]-KT. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu ruang (20-22 °C) selama dua jam (*holding time*), selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Setelah sentrifus supernatan dibuang dan natan hasil sentrifus diencerkan kembali dengan pengencer semen beku sesuai perlakuan.

Semen yang telah diencerkan dikemas dalam *straw* 0.5 ml, dengan konsentrasi 200 juta/0.5 ml, kemudian disusun dalam rak pembekuan dan diekuilibrasi pada suhu 4-5 °C selama dua jam. Setelah itu dilanjutkan pembekuan semen di atas permukaan uap N₂ cair selama 20 menit (Yi *et al.*2008) dan disimpan di dalam kontainer N₂ cair (-196 °C) untuk pengujian lebih lanjut.

Evaluasi Pasca Pembekuan

Evaluasi semen beku pasca pembekuan dilakukan minimal 24 jam

setelah penyimpanan. Tahapan evaluasi pasca pembekuan meliputi: *straw* semen beku dicairkan kembali (*thawing*) dalam *waterbath* dengan suhu 37 °C selama 30 detik. Setelah itu dilakukan pemeriksaan meliputi perhitungan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa seperti yang dilakukan pada tahapan evaluasi diatas.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap I untuk karakteristik semen segar dilakukan secara deskriptif sedangkan tahap II dengan menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL). Data dianalisis dengan menggunakan uji sidik ragam jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji berganda Duncan sesuai petunjuk Steel dan Torrie (1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Tujuan dari pemeriksaan karakteristik semen segar babi *Duroc* untuk mengetahui tingkat pengenceran yang akan digunakan. Pemeriksaan makroskopis menunjukkan volume semen adalah 166 ± 1.5 ml, berwarna putih keruh dengan konsistensi encer dan $\text{pH} 7.4 \pm 0.07$, hasil ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan volume semen segar berkisar

100-250 juta sel/ml dengan pH berkisar 7.4-7.8 (Garner dan Hafez 2000) (Tabel 1). Hasil pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa menunjukkan rerata 82.33 ± 0.66 , dengan konsentrasi spermatozoa 426.26 ± 2.16 juta spermatozoa/ml dengan persentase viabilitas spermatozoa 89.14 ± 0.6 dan abnormalitas spermatozoa $6.63 \pm 0.4\%$ (Tabel 1). Pemeriksaan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada penelitian ini tidak jauh berbeda dengan

Tabel 1 Karakteristik semen segar babi (Mean \pm SEM)

Karakteristik	D1	D2	D3	Rerata (Mean \pm SEM)
Makroskopis				
Volume (ml)	170 \pm 1,00	188 \pm 1.18	138 \pm 1.02	166 \pm 1.5
Warna	Putih keruh	Putih keruh	Putih keruh	Putih keruh
pH	7.42 \pm 0.02	7.34 \pm 0.06	7.58 \pm 0.05	7.4 \pm 0.07
Konsistensi	Encer	Encer	Encer	Encer
Mikroskopis				
Motilitas Spermatozoa (%)	83 \pm 1.5	83 \pm 2	81 \pm 1.58	82.33 \pm 0.66
Velocity	3	3	3	3
Konsentrasi Spermatozoa (10 ⁶ sel/ml)	420.4 \pm 4.96	466.4 \pm 4.27	395 \pm 2.13	426.26 \pm 2.16
Viabilitas Spermatozoa (%)	89.34 \pm 0.34	88.84 \pm 0.55	88.59 \pm 0.44	89.14 \pm 0.6
Abnormalitas Spermatozoa (%)	6.14 \pm 1.73	6.19 \pm 1.15	7.57 \pm 1.50	6.63 \pm 0.4

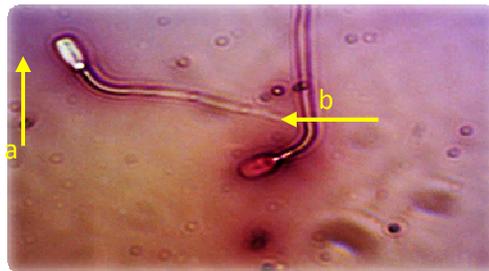
hasil penelitian sebelumnya yaitu berkisar 50-80% dan 70-90% (Garner dan

Hafez 2000).

Berdasarkan hasil evaluasi semen segar tersebut seluruh semen yang dikoleksi mempunyai kualitas yang baik dan layak untuk diproses menjadi semen beku yaitu dengan konsentrasi spermatozoa lebih dari 200 juta sel spermatozoa/ml (Garner dan Hafez 2000), persentase abnormalitas kurang dari 20% (Johnson *et al.*2000).

Menurut Graham *et al.*(2004), pengukuran viabilitas spermatozoa hidup mempunyai prinsip kerja yang tidak jauh berbeda dengan prinsip kerja pompa ion

dalam memelihara keutuhan membran plasma. Dengan menggunakan pewarnaan *eosin nigrosin*, spermatozoa yang mati mempunyai permeabilitas membran yang tinggi jika dibandingkan dengan yang hidup sehingga akan menyerap warna yang dipaparkan sedangkan spermatozoa yang hidup tidak akan menyerap warna (transparan) pada bagian kepala spermatozoa (Gambar 1).



Gambar 1. Spermatozoa hidup dan mati dengan pewarnaan eosin nigrosin (a) spermatozoa hidup dan (b) spermatozoa mati (perbesaran 400 kali)

Jenis Pengencer	Setelah pengenceran	Setelah equilibrasi	Setelah thawing
	(Mean±SEM)	(Mean±SEM)	(Mean±SEM)
BTS-G	85.86±0.28 ^b	66.78±1.67 ^b	49.09±0.7 ^b
BTS-D	86.17±0.24 ^a	71.06±2.0 ^a	52.14±0.4 ^a
BTS-GD	85.45±0.19 ^c	64.28±0.80 ^c	46.96±0.28 ^c

Persentase viabilitas spermatozoa dalam berbagai tahapan dari post pengenceran, equilibrasi, dan *post thawing*

Hasil penelitian viabilitas spermatozoa dalam pengencer BTS-DMA dari setiap tahapan pembekuan semen babi baik tahapan setelah sentrifus/post pengenceran, equilibrasi dan *post thawing* lebih baik jika dibandingkan pengencer lainnya (Tabel 2).

Tabel 2. Persentase viabilitas spermatozoa dalam berbagai tahapan pembekuan

Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf nyata 5 %;

pengencer BTS-gliserol (BTS_G); BTS-DMA (BTS_D); BTS-DMA (BTS_{D-G})

Pengencer BTS yang dikombinasi dengan krioprotektan DMA lebih baik, hal ini dikarenakan berat molekul krioprotektan DMA lebih kecil (87.12 g/mol) dibandingkan dengan krioprotektan gliserol (92.05 g/mol) sehingga molekul DMA dapat dengan mudah melewati membran plasma

spermatozoa jika dibandingkan dengan krioprotektan gliserol. Menurut Medeiros *et al.* (2002) golongan amida juga memiliki toksisitas yang lebih rendah jika dibandingkan gliserol dan dapat dipakai untuk semen yang berasal dari pejantan yang sensitif terhadap gliserol.

Hasil *post thawing* persentase viabilitas spermatozoa dalam pengencer BTS-DMA 52.14±0.4%, berbeda nyata (P<0.05) jika dibandingkan dengan BTS-G 49.09±0.7%, BTS-G-DMA 46.96±0.28%. Dari hasil diatas membuktikan bahwa viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer BTS-KT yang yang ditambahkan dengan krioprotektan DMA lebih baik jika dibandingkan krioprotektan lainnya.

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa terjadi pada semua tahap pembekuan, namun penurunan yang tinggi terjadi pada saat pembekuan?? dan *thawing*. Rendahnya persentase viabilitas setelah *thawing* ini kemungkinan berhubungan dengan komposisi asam lemak pada membran plasma spermatozoa. Komposisi membran

plasma spermatozoa babi mengandung *sphingomyelin* 14% dan *phosphatidylethanolamine* 24% yang lebih tinggi jika dibandingkan pada sapi 9.7% dan 11.5%. Rendahnya kualitas semen beku yang dihasilkan salah satu kemungkinan akibat belum optimalnya kerja dari krioprotektan sehingga perlu mencari jenis dan konsentrasi krioprotektan yang tepat.

SIMPULAN

Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bahan pengencer BTS yang dikombinasi dengan krioprotektan DMA lebih baik dalam mempertahankan kualitas semen beku babi dibandingkan dengan pengencer lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62: 1160-1172.
- Arifiantini RI. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. IPB press: Bogor. Pp 69-71.
- Gadea J. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of Swine. *J of Agri Res.1(2): 17-27*
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B, Hafez ESE, editor. *Reproduction in Farm Animals*. 7thEd. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins. Pp 96-109.
- Graham LH, Bando J, Gray C, Buhr MM. 2004. Liquid storage of asian (*Elephas Maximus*) sperm at 4 °C. *J Anim Reprod Sci*. 80: 329-340.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *J Anim Reprod Sci*. 62: 143-172.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *J Anim Reprod Sci*. 62: 113-141
- Medeiros ASL, Gomes GM, Rarmo MP, Papa FO, Alverangga MA. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 58: 273-276.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *J Small Ruminant Res*. 63: 215-225
- Paulenz H, Kommisrud E, Hofmof PO. 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *J Anim Reprod Dom*. 35: 83-85.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. Prinsip Dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometrik. Sumantri B, penerjemah. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Yi JK, Ko HJ, Lee HS, Yang BC, Park CS. 2008. In vitro fertilization and development of pig oocytes inseminated with boar sperm washing media after thawing of the frozen straw. *J Asian-Aus Anim Sci*. 17(2): 164-167