

PENGARUH WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU BABI LANDRACE DALAM PENGECER DURASPERM TERMODIFIKASI

(EFFECT OF EQUILIBRATION TIME ON THE QUALITY OF LANDRACE BOAR FROZEN SEMEN IN MODIFIED DURASPERM EXTENDER)

Sofia Marlize^{*}, Thomas M. Hine, Wilmientje M. Nalley

Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana, Jln. Adisucipto Penfui, Kupang 850001

^{*}Correspondent author, email: sofiamarlize80@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas spermatozoa babi landrace baik pada pra- maupun pasca- pembekuan serta menemukan waktu ekuilibrasi terbaik. Materi yang digunakan adalah semen segar yang ditampung dari seekor babi landrace yang berumur 2,5 tahun. Penampungan dilakukan dua kali per-minggu dengan menggunakan glove hand method. Semen yang berkualitas baik (motilitas sperma $\geq 70\%$, konsentrasi sperma $\geq 200 \times 10^6$ sel/ml, dan persentase abnormalitas sperma $\leq 15\%$) diencerkan dengan durasperm yang telah dimodifikasi dengan air buah lontar, sedangkan krioprotektannya menggunakan gliserol dan sukrosa. Holding time dilakukan selama 2 jam pada suhu 27-28°C, disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit, dan endapan spermatozoa diencerkan dengan pengencer yang sama. Setelah itu, semen cair tersebut dikemas dalam straw 0.5 mL dan diekuilibrasi pada suhu 3-5°C selama 1 (P1), 2 (P2), atau 3 jam (P3). Pembekuan semen dilakukan di atas permukaan nitrogen cair berjarak 5 cm selama 10 menit, dan selanjutnya disimpan di dalam container nitrogen cair. Thawing dilakukan dengan menempatkan straw semen beku ke dalam air hangat (37°C) selama 30 detik. Data penelitian dianalisis dengan analisis ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi pada perlakuan 2 jam (P2) memberikan hasil terbaik ($P < 0,05$) dengan rerata persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, membran plasma utuh dan recovery rate sperma secara berturut-turut adalah 30,62%, 58,21%, 4,68%, 58,94% dan 43,74%. Disimpulkan bahwa waktu ekuilibrasi tidak memengaruhi kualitas spermatozoa pra-pembekuan, namun berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa pasca-pembekuan, dengan waktu ekuilibrasi terbaik untuk mempertahankan kualitas semen beku babi landrace adalah 2 jam.

Kata-kata kunci: waktu ekuilibrasi, kualitas semen beku, babi landrace, durasperm modifikasi

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of equilibration time on the quality of landrace spermatozoa both pre- and post-freezing and to find the best equilibration time. The materials used is fresh semen collected from a 2,5 years old landrace boar. Collecting was carried out twice per week using the glove hand method. Semen of good quality (sperm motility $\geq 70\%$, sperm concentration $\geq 200 \times 10^6$ cells/ml, and percentage of sperm abnormalities $\leq 15\%$) was diluted with durasperm that had been modified with lontar fruit juice, while the cryoprotectants used glycerol and sucrose. Holding time was carried out for 2 hour at 27-28°C, centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes, and the sperm sediment was diluted with the same diluent. After that, the liquid semen was packed in a 0.5 mL straw and equilibrated at 3-5°C for 1 (P1), 2 (P2), or 3 hours (P3). The freezing of semen was carried out on the surface of liquid nitrogen at a distance of 5 cm for 10 minutes, and then stored in a liquid nitrogen container. Thawing is done by placing the frozen semen straws in warm water (37°C) for 30 seconds. The research data were analyzed with analysis of variance and continued with the Duncan test. The results showed that the equilibration time at 2 hours (P2) gave the best results ($P < 0,05$) with the mean percentage of motility, viability, abnormality, intact plasma membrane and recovery rate respectively were 30,62%, 58,21%, 4,68%, 58,94% and 43,74%. It was concluded that the equilibration time did not affect the quality of pre-freezing spermatozoa, but it did affect the quality of post-freezing spermatozoa with the best equilibration time to maintain the quality of frozen semen of landrace boar was 2 hours.

Keywords: equilibration time, frozen semen quality, landrace boar, modified durasperm

PENDAHULUAN

Babi merupakan salah satu komoditas ternak penghasil daging yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan. Hal ini dikarenakan ternak babi memiliki sifat dan kemampuan yang

menguntungkan antara lain pertumbuhan yang cepat dan jumlah anak per kelahiran (litter size) yang tinggi. Jenis bangsa babi yang umum dikonsumsi di Indonesia adalah babi landrace, babi duroc, dan babi hasil persilangan lainnya.

Jenis usaha peternakan babi di Nusa Tenggara Timur (NTT) masih merupakan peternakan rakyat berskala kecil atau skala rumah tangga, dimana upaya peningkatan mutu genetik terutama populasi masih kurang diperhatikan. Menurut Ardana dan Putra (2008), sistem pemeliharaan yang masih tradisional dapat memengaruhi peningkatan produktivitas ternak babi baik usaha penggemukan maupun pembibitan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi dan mutu genetik ternak babi adalah dengan menerapkan program inseminasi buatan.

Inseminasi buatan merupakan salah satu teknologi yang sangat populer pada ternak saat ini. Menurut Arifiantini (2012), IB merupakan salah satu teknik perkawinan buatan menggunakan semen dari pejantan terseleksi untuk memperoleh ternak unggul serta mencegah inbreeding dan penyebaran penyakit pada ternak. Teknologi ini telah diterapkan pada ternak sapi, kambing, kuda, ayam, begitu juga dengan ternak babi. Inseminasi pada ternak babi dengan menggunakan semen cair telah sangat luas diterapkan, namun inseminasi dengan menggunakan semen beku sangat jarang diterapkan karena sensitivitas spermatozoa babi terhadap suhu dingin (cold shock) sangat tinggi sehingga dapat mengakibatkan kerusakan bahkan kematian pada sel akibat proses kristalisasi es. Semen babi hanya dapat bertahan

pada suhu berkisar 15-20°C (Sumardani *et al.*, 2008). Oleh karena itu, upaya dalam mengatasi hal tersebut adalah dengan cara menambahkan krioprotektan ke dalam pengencer.

Krioprotektan merupakan zat kimia non-elektrolit yang berfungsi mereduksi proses pemaparan kriopreservasi sel dari efek larutan maupun pembentukan kristal es secara ekstra maupun intraseluler sehingga motilitas sel setelah kriopreservasi dapat terjaga. Selain dengan penambahan krioprotektan ke dalam pengencer, waktu ekuilibrasi juga merupakan faktor yang sangat menentukan keberhasilan pembekuan semen, khususnya ternak babi. Waktu ekuilibrasi merupakan periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya pada saat pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah. Waktu ekuilibrasi didefinisikan sebagai waktu yang dibutuhkan oleh krioprotektan untuk mencapai keseimbangan osmosis pada kedua sisi membran plasma spermatozoa (Bearden *et al.*, 2004).

Informasi tentang waktu ekuilibrasi pada semen ternak lain telah banyak diketahui, sedangkan pada semen babi masih sangat minim. Untuk itu, telah dilakukan penelitian tentang "Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku babi landrace dalam pengencer durasperm modifikasi". Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku babi landrace dalam pengencer durasperm modifikasi.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan semen yang ditampung dari seekor babi landrace jantan berumur 2,5 tahun, kondisi sehat, organ reproduksi normal dan telah terlatih untuk penampungan semen. Ternak tersebut dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan air minum. Pakan yang diberikan berupa konsentrat sebanyak 3 kg/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL), dengan tiga perlakuan dan empat ulangan (penampungan

semen) sehingga terbentuk 12 unit percobaan. Yang menjadi perlakuan adalah waktu ekuilibrasi sperma sebelum dilakukan pembekuan, sedangkan ulangannya adalah waktu penampungan semen.

Pembuatan Pengencer Durasperm Modifikasi

Persiapan kuning telur, yaitu: (1) telur ayam dicuci bersih dan dikeringkan dengan menggunakan tissue, (2) bersihkan telur dengan alkohol 70%, (3) pecahkan telur dan pisahkan antara putih dan kuning telurnya, (4) kuning telur dipindahkan ke atas kertas saring agar menyerap sisa putih telur, (5) pecahkan selaput vitelinnya, masukkan kuning telur ke dalam

gelas ukur (20 ml) dan kuning telur siap digunakan sesuai kebutuhan.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan pengencer durasperm modifikasi sebagai pengencer dasar yakni dengan cara: 50 g durasperm dilarutkan dalam 1000 mL aquabidest dan dihomogenkan. Kemudian, ambil 94 mL pengencer durasperm tambahkan 6 mL air buah lontar lalu homogenkan. Untuk pengencer perlakuan dibuat dengan cara: sukrosa ditimbang sebanyak 0,03 gram (3%), kemudian dituang dalam tabung elenmeyer. Selanjutnya, tuangkan 100 mL pengencer dasar ke dalam tabung elenmeyer yang berisi sukrosa dan dihomogenkan. Tahap terakhir adalah ambil 97 mL pengencer dasar + sukrosa, tambahkan gliserol sebanyak 3% lalu dihomogenkan.

Penampungan Semen

Semen ditampung dua kali seminggu dengan menggunakan metode manual/glove hand method. Semen yang diperoleh kemudian dievaluasi secara makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH) dan mikroskopis (konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh spermatozoa). Semen segar yang akan digunakan harus memenuhi syarat, yaitu memiliki motilitas sperma minimal 70%, konsentrasi sperma minimal 200 x 10⁶ sel/mL, dan persentase abnormalitas tidak lebih dari 15%. Semen yang telah memenuhi syarat kemudian diencerkan dengan menggunakan pengencer dasar durasperm modifikasi.

Pengenceran Semen dan Ekuilibrasi

Semen segar yang telah memenuhi syarat kemudian diencerkan menggunakan pengencer dasar dengan perbandingan 1:1. Proses pengenceran semen dilakukan dengan cara meneteskan sperma ke dalam tabung pengencer melalui dinding tabung secara perlahan agar spermatozoa tidak terkejut dan dapat menyesuaikan diri dengan pengencer.

Semen yang telah diencerkan kemudian di holding time selama 2 jam pada suhu 27-28°C. Setelah holding time, semen disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Cairan supernatant dibuang dan pellet diencerkan kembali dengan pengencer dasar 1:1. Setelah itu, semen diencerkan dengan pengencer perlakuan kemudian di packing dalam straw 0.50 mL (mengandung 500 x 10⁶ sel spermatozoa) dan diberi label untuk diekuilibrasi pada suhu 3-5°C selama 1 jam, 2 jam, atau 3 jam.

Pembekuan dan Penyimpanan Semen

Pembekuan semen dilaksanakan dengan menempatkan rak yang berisi straw semen di atas permukaan N₂ cair (suhu ± -110°C) berjarak 5 cm selama 10 menit. Setelah itu, straw tersebut dicemplungkan dalam N₂ cair (suhu ± -196°C) dan disimpan selama 24 jam.

Evaluasi Kualitas Semen Beku

Evaluasi kualitas semen beku dilakukan dengan cara mengeluarkan straw semen beku dari dalam container nitrogen cair dan menempatkannya ke dalam air hangat bersuhu 37°C selama 30 detik. Evaluasi kualitas sperma dilakukan di bawah pengamatan mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Variabel Penelitian

Variabel penelitian meliputi: (1) motilitas spermatozoa (%): pemeriksaan gerakan spermatozoa yang bergerak aktif ke depan (progresif). Penilaian dilakukan di bawah mikroskop pada pembesaran 400 kali secara subjektif pada lapang pandang yang berbeda. Nilai yang diberikan berkisar antara 0-100% dengan skala 5%.

(2) Viabilitas spermatozoa (%): perbandingan jumlah spermatozoa yang hidup dengan total spermatozoa. Evaluasi viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan eosin dan diamati di bawah mikroskop pada pembesaran 400 kali. Spermatozoa hidup ditandai dengan kepala berwarna putih (tidak menyerap zat warna eosin), sedangkan yang mati berwarna merah atau merah muda (menyerap zat warna eosin) (Herdis & Rizal, 2008).

(3) Abnormalitas spermatozoa (%): perbandingan antara spermatozoa yang abnormal dengan total spermatozoa. Evaluasi abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan cara pewarnaan diferensial eosin dan diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa yang abnormal ditandai dengan kelainan pada kepala dan ekor yakni berupa kepala mengecil atau membesar, ekor putus atau hilang.

(4) Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa (%): perbandingan antara jumlah spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh dengan total spermatozoa. Keutuhan membran plasma spermatozoa dievaluasi dengan metode osmotic resistance test (ORT) atau hypoosmotic swelling (HOS) test. Spermatozoa yang memiliki membran plasma yang utuh

ditandai dengan ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang memiliki membran yang rusak ditandai dengan ekor lurus dan panjang tanpa ujung.

(5) Recovery rate (%): merupakan kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan membandingkan persentase

spermatozoa motil pasca thawing dengan spermatozoa motil pada semen segar.

Data penelitian dianalisis menggunakan *Analisis of Variance* (Anova) dan dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan program SPSS versi 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Kualitas semen segar babi landrace ditampilkan pada Tabel 1. Hasil evaluasi terhadap kualitas semen segar babi landrace selama empat kali penampungan cukup baik dan memenuhi syarat untuk dibekukan.

Rataan volume semen yang diperoleh dalam penelitian ini cukup rendah jika dibandingkan dengan hasil penelitian Foeh (2015), yakni volume semen berkisar 139-205 mL dengan rerata $176 \pm 4,85$ ml dan Feka *et al.* (2016) yang memperoleh volume semen sebanyak 200 mL. Meskipun demikian, hasil

penelitian ini masih tergolong normal dan tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Ax *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa volume semen babi berkisar 100-450 mL. Beberapa faktor yang memengaruhi karakteristik secara makroskopis adalah variasi umur dari pejantan, tingkat stimulasi, kualitas pakan dan frekuensi ejakulasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Parker (2000), bahwa adanya variasi dalam volume semen dipengaruhi oleh umur ternak, metode penampungan, jumlah sampel dan frekuensi penampungan.

Tabel 1. Karakteristik Semen Segar Babi Landrace

Karakteristik semen	Nilai rata-ran
Volume (mL)	119,50±20,49
Warna	Putih susu
Konsistensi	Encer
pH	6,62±0,15
Konsentrasi spermatozoa ($\times 10^6$ sel/mL)	250,50±32,56
Motilitas spermatozoa (%)	70,00±0,00
Viabilitas spermatozoa (%)	85,50±3,57
Abnormalitas spermatozoa (%)	3,54±0,38
MPU spermatozoa (%)	86,31±3,47

Warna semen yang diperoleh dari penelitian adalah putih susu dengan konsistensi encer. Warna semen dan konsistensi semen yang diperoleh dalam penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Subrata *et al.* (2014), yang melaporkan bahwa warna semen babi adalah putih keabuan dan Foeh *et al.* (2017), yang memperoleh warna semen babi putih keruh. Sedangkan, pH yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 6,62 dan masih dalam kategori normal menurut Garner dan Hafez (2000), yakni berkisar antara 6,4-7,8. Adapun beberapa faktor yang memengaruhi perbedaan warna, konsistensi dan pH semen ialah umur, tingkat rangsangan, frekuensi ejakulasi, kualitas pakan dan lingkungan (Johnson *et al.*, 2000).

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa adalah 70,00%. Hasil tersebut lebih tinggi dari

hasil penelitian Sumardani (2007), yang melaporkan bahwa motilitas spermatozoa adalah 65,56%. Sedangkan, konsentrasi spermatozoa yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah $250,50 \times 10^6$ sel/ml dan tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Garner dan Hafez (2000) serta Knox (2006), yakni konsentrasi spermatozoa berkisar antara $200-600 \times 10^6$ sel/ml. Beberapa faktor yang memengaruhi motilitas dan konsentrasi spermatozoa antara lain ialah umur, jumlah ejakulat, interval penampungan, kondisi pejantan dan lingkungan (Sumardani *et al.*, 2019 dan Johnson *et al.*, 2000).

Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa yang hidup diidentifikasi dengan tidak menyerap warna (transparan) pada bagian kepala spermatozoa, sedangkan spermatozoa yang mati ditandai dengan menyerap warna

merah pada bagian kepala spermatozoa karena permeabilitas spermatozoa yang meningkat. Rataan viabilitas spermatozoa dari penelitian ini adalah 85,32%. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan yang dilaporkan Sumardani *et al.* (2008) bahwa rata-rata viabilitas spermatozoa adalah 87,76% dan hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian Kaka (2020) yang melaporkan rata-rata viabilitas spermatozoa babi landrace adalah 79,19%. Perbedaan kualitas semen ini dipengaruhi oleh umur ternak, tingkat rangsangan, frekuensi ejakulat, lingkungan dan kualitas pakan (Feradis, 2010).

Pemeriksaan spermatozoa yang abnormal penting dilakukan sebab abnormalitas yang tinggi akan mengganggu fertilitas pejantan secara umum (Garner dan Hafez, 2000). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa presentase abnormalitas spermatozoa adalah 3,54%. Hasil ini tergolong sangat baik karena menurut Johnson *et al.* (2000), persentase abnormalitas spermatozoa babi perezakulat tidak lebih dari 20%. Secara umum, abnormalitas pada spermatozoa dapat disebabkan oleh berbagai faktor antara lain genetik, stres, suhu lingkungan, penyakit dan bahkan perlakuan pada saat pembekuan semen (Arifiantini dan Ferdian, 2006).

Hasil pemeriksaan keutuhan membran plasma (MPU) spermatozoa diidentifikasi dengan ekor menggelembung atau melingkar, sedangkan untuk yang rusak ditandai dengan ekor lurus dan panjang tanpa ujung. Nilai rata-rata membran plasma utuh spermatozoa yang diperoleh dari penelitian ini adalah 86,31%. Hasil ini lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Sangma *et al.* (2020) yang melaporkan bahwa nilai rata-rata membran plasma utuh spermatozoa adalah 81,74%. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh (Surachman *et al.*, 2009).

Motilitas Spermatozoa Pra- dan Pasca Pembekuan

Motilitas adalah pergerakan spermatozoa secara progresif atau pergerakan aktif maju ke depan. Kemampuan spermatozoa untuk bergerak progresif memiliki korelasi positif terhadap tingkat fertilitas spermatozoa. Oleh karena itu, penilaian motilitas digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa dalam membuahi sel telur atau ovum. Motilitas spermatozoa pada berbagai waktu ekuilibrasi ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Motilitas Spermatozoa Babi Landrace pada berbagai Waktu Ekuilibrasi

Tahapan pengamatan	Waktu ekuilibrasi (jam)		
	1	2	3
Sesudah pengenceran	70,00±0,00	70,00±0,00	70,00±0,00
Sesudah ekuilibrasi	65,62±3,75 ^a	64,38±3,14 ^a	65,62±2,39 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	21,88±3,75 ^{ab}	30,62±8,51 ^b	18,75±4,33 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi memberikan pengaruh yang tidak nyata (P>0,05) terhadap motilitas spermatozoa sebelum pembekuan (sesudah ekuilibrasi), namun memberikan pengaruh yang nyata (P<0,05) terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan (pasca *thawing*) (Tabel 2).

Berdasarkan hasil uji lanjut, ditemukan bahwa waktu ekuilibrasi 1 jam berbeda tidak nyata (P>0,05) dengan waktu ekuilibrasi selama 2 dan 3 jam, sedangkan waktu ekuilibrasi 2 jam berbeda nyata (P<0,05) dengan waktu ekuilibrasi 3 jam. Waktu ekuilibrasi selama 2 jam sesudah *thawing* menghasilkan persentase motilitas yang lebih tinggi (30,62%) dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam (21,88%) dan 3 jam (18,75%). Hal ini didukung

juga dengan tingkat penurunan persentase motilitas spermatozoa sejak pengenceran hingga *thawing*, dimana waktu ekuilibrasi 2 jam menghasilkan laju penurunan motilitas spermatozoa yang lebih rendah (39,38%) dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam (48,12%) dan 3 jam (51,25%).

Ekuilibrasi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh spermatozoa sebelum pembekuan agar dapat menyesuaikan diri dengan pengencer, sehingga pada saat pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah. Perbedaan waktu ekuilibrasi menyebabkan motilitas spermatozoa setelah pembekuan juga berbeda. Pada waktu ekuilibrasi yang optimum maka akan dicapai nilai motilitas spermatozoa yang tinggi, karena waktu ekuilibrasi yang optimum akan

memberikan kesempatan terbaik bagi gliserol untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh cold shock dan pembentukan kristal es selama proses pembekuan. Sebaliknya, jika waktu ekuilibrasi belum optimum maka motilitas spermatozoa yang dihasilkan kurang baik. Pada saat ekuilibrasi, selain terjadi keseimbangan konsentrasi gliserol, juga komponen ekstender osmosis lainnya akan berada dalam keadaan yang seimbang antara di luar sel dan di dalam sel (Salamon dan Maxwell, 2000).

Motilitas tertinggi terdapat pada perlakuan dengan waktu ekuilibrasi 2 jam; hal ini mengindikasikan bahwa waktu tersebut merupakan waktu yang optimum bagi spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan pengencer. Pada tahap ini, gliserol telah secara sempurna berdifusi ke dalam sel spermatozoa dan berhasil menciptakan konsentrasi intra dan ekstraseluler yang seimbang (Salamon dan Maxwell, 2000). Pada waktu ekuilibrasi 1 jam, persentase motilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan ekuilibrasi selama 2 jam diduga karena proses pengeluaran air dari dalam sel masih sedikit yang diakibatkan karena gliserol belum berdifusi secara optimal ke dalam sel, sehingga pada saat pembekuan terjadi proses kristalisasi es yang berakibat pada kematian spermatozoa. Pendapat ini didukung oleh Pangestu (2002), yang menyatakan bahwa apabila suatu sel didinginkan terlalu cepat, maka air yang ada di dalam sel akan keluar dalam jumlah yang sedikit sehingga belum mencapai tahap ekuilibrium yang sempurna. Sebaliknya, pada waktu ekuilibrasi 3 jam persentase motilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 dan 2 jam diduga karena kontak antara gliserol dan spermatozoa terjadi secara berlebihan, sehingga menyebabkan gliserol berubah menjadi toksik dan mengakibatkan kematian pada spermatozoa. Pendapat ini didukung oleh Umar dan Maharani (2005), yang menyatakan bahwa waktu ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak antara gliserol dan spermatozoa terjadi secara berlebihan sehingga gliserol akan menjadi toksik bagi spermatozoa.

Hasil dari penelitian ini tidak berbeda jauh dengan yang dilaporkan oleh Yusuf *et al.* (2017), dimana persentase motilitas spermatozoa babi pasca thawing yang diekuilibrasi selama 2 jam menghasilkan rerata motilitas $30,00 \pm 4,47\%$ dalam pengencer BTS-gliserol-Trehalosa, dan hasil dari penelitian ini lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Foeh (2015) yakni persentase

motilitas spermatozoa babi setelah thawing adalah $20,92 \pm 0,91\%$ dalam pengencer BTS-DMA. Namun, jika dibandingkan dengan kualitas semen beku ternak lainnya, kualitas semen beku babi masih tergolong sangat rendah. Pada ternak sapi, kualitas semen beku yang diekuilibrasi selama 5 jam cukup tinggi yakni motilitas pasca thawing mencapai $44,15\%$ (Febriani *et al.*, 2014), pada kambing $51,20\%$ (Naing *et al.*, 2010), pada ternak domba $49,0\%$ hingga $58,4\%$ (Bag *et al.*, 2001), dan pada rusa motilitas pasca thawing mencapai $52,50\%$ dengan waktu ekuilibrasi 4 jam (Nalley *et al.*, 2011). Rendahnya motilitas pasca thawing ini kemungkinan berhubungan dengan komposisi asam lemak dan phospholipid yang berbeda dengan ternak lainnya, yaitu komposisi phosphatidylethanolamine dan sphingomyelin pada membran plasma spermatozoa babi mencapai 24% dan 14% (Garner dan Hafez, 2000), jauh lebih tinggi daripada spermatozoa sapi yaitu $9,7\%$ dan $11,5\%$. Hal ini yang membuat permeabilitas membran plasma spermatozoa makin menurun dan mengakibatkan spermatozoa mudah mati. Komposisi protein plasma semen dan membran spermatozoa yang bervariasi antar individu juga menyebabkan hilangnya daya gerak dan viabilitas dari spermatozoa karena pengaruh pembekuan.

Viabilitas Spermatozoa Pra- dan Pasca Pembekuan

Viabilitas spermatozoa merupakan indikator untuk menilai kualitas semen. Semakin tinggi persentase viabilitas spermatozoa maka semakin baik kualitas semen tersebut (Herdis dan Rizal, 2008). Penilaian viabilitas dilakukan secara obyektif menggunakan pewarnaan diferensial. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan kepala spermatozoa yang transparan karena tidak menyerap warna (eosin), sedangkan kepala spermatozoa yang mati akan berwarna merah karena menyerap warna (eosin). Pemeriksaan viabilitas spermatozoa penting dilakukan karena berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa. Semakin tinggi viabilitas spermatozoa, semakin tinggi pula motilitas spermatozoa karena hanya spermatozoa yang hidup yang dapat bergerak. Walaupun demikian, persentase viabilitas spermatozoa lebih tinggi daripada spermatozoa motil karena jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semuanya motil progresif (Kostaman dan Utama, 2006).

Berdasarkan hasil analisis statistik, waktu ekuilibrasi memberikan pengaruh yang tidak nyata ($P>0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa

sebelum pembekuan (setelah ekuilibrasi), namun berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa pasca thawing (Tabel 3).

Tabel 3. Viabilitas Spermatozoa Babi Landrace pada berbagai Waktu Ekuilibrasi

Tahapan pengamatan	Waktu ekuilibrasi (jam)		
	1	2	3
Sesudah pengenceran	85,32±3,21	85,32±3,21	85,32±3,21
Sesudah ekuilibrasi	80,24±5,03 ^a	81,72±4,54 ^a	82,39±3,84 ^a
Sesudah thawing	42,02±5,56 ^a	58,21±12,70 ^b	37,90±9,04 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0,05$)

Viabilitas spermatozoa pasca thawing pada waktu ekuilibrasi 2 jam berbeda nyata ($P<0,05$) dengan 1 dan 3 jam, namun waktu ekuilibrasi 1 jam berbeda tidak nyata ($P>0,05$) dengan 3 jam. Hal ini didukung juga dengan adanya penurunan persentase viabilitas spermatozoa yang lebih rendah pada waktu ekuilibrasi selama 2 jam yaitu 27,11%, dibandingkan dengan waktu ekuilibrasi selama 1 jam (43,30%) dan 3 jam (47,42%).

Perlakuan dengan waktu ekuilibrasi 2 jam sesudah thawing menghasilkan persentase viabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Pada waktu ekuilibrasi 2 jam, krioprotektan gliserol sudah secara optimal masuk ke dalam sel spermatozoa dan berhasil menciptakan keseimbangan elektrolit antara di dalam dan di luar sel sehingga spermatozoa dapat terlindungi dari kematian. Selain itu, sukrosa yang terkandung di dalam pengencer telah optimal dalam mengatur keseimbangan pasase air yang masuk dan keluar sel sehingga spermatozoa dapat terhindar dari kematian akibat penggembungan atau pengkerutan yang berlebihan pada saat thawing.

Rendahnya viabilitas spermatozoa pasca thawing pada waktu ekuilibrasi selama 1 jam disebabkan gliserol belum berdifusi secara optimal ke dalam sel dan proses pengeluaran air masih sedikit sehingga belum mencapai tahap ekuilibrium yang sempurna (Pangestu, 2002). Air yang masih berada dalam sel tersebut akhirnya berubah bentuk menjadi es atau disebut intracellular ice formation (IIF) yang akan merusak sel spermatozoa dan mengakibatkan kematian sel. Sebaliknya, penyebab rendahnya viabilitas spermatozoa pasca thawing pada waktu ekuilibrasi 3 jam disebabkan proses pengeluaran air oleh gliserol terjadi secara berlebihan yang mengakibatkan sel mengalami dehidrasi dan akhirnya mengkerut sehingga berakibat pada kematian sel spermatozoa. Penyebab lainnya adalah kontak antara gliserol dan spermatozoa

terjadi secara berlebihan sehingga menyebabkan gliserol menjadi toksik bagi spermatozoa dan mengakibatkan kematian pada sel itu sendiri. Pendapat ini didukung oleh Umar dan Maharani (2005), yang menyatakan bahwa waktu ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak antara gliserol dan spermatozoa terjadi secara berlebihan sehingga gliserol akan menjadi toksik bagi spermatozoa.

Viabilitas spermatozoa pasca thawing pada penelitian ini sedikit lebih rendah dari hasil penelitian Yusuf *et al.* (2017), yakni persentase viabilitas spermatozoa babi pasca thawing yang diekuilibrasi selama 2 jam mencapai 68,20-70,80%, namun lebih tinggi dari hasil penelitian Foeh *et al.* (2017) yang melaporkan viabilitas spermatozoa pasca thawing sebesar 44,84% dalam pengencer BTS-gliserol-SDS (Sodium dodecyl sulphate).

Abnormalitas Spermatozoa Pra- dan Pasca Pembekuan

Abnormalitas spermatozoa merupakan salah satu indikator dalam menentukan kualitas spermatozoa karena struktur sel yang abnormal dapat menyebabkan gangguan dan hambatan pada saat fertilisasi (Afiati *et al.*, 2015).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa pra-pembekuan (ekuilibrasi), namun berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa pasca thawing. Persentase abnormalitas spermatozoa pasca thawing pada waktu ekuilibrasi 2 jam secara nyata ($P<0,05$) lebih rendah (4,68%) dibandingkan dengan waktu ekuilibrasi 1 jam (5,53%) dan 3 jam (6,72%) (Tabel 4); namun tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P>0,05$) antara waktu ekuilibrasi 1 jam dengan 2 jam. Hal ini didukung oleh tingkat peningkatan abnormalitas pada ekuilibrasi 2 jam dari pengenceran sampai thawing yang tidak terlalu

tinggi (1,24%) dibandingkan pada ekuilibrasi 1 jam (2,09%) dan 3 jam (3,44%).

Tingginya abnormalitas spermatozoa pada ekuilibrasi 3 jam mungkin disebabkan oleh karena gliserol telah banyak menarik air dari dalam sel yang menyebabkan sel mengalami dehidrasi dan mengkerut, sehingga terjadi

kerusakan sel secara mekanik yang berdampak pada tingkat abnormalitasnya. Pendapat ini didukung oleh Best (2006) yang menyatakan bahwa gliserol akan menarik air dari dalam sel spermatozoa yang menyebabkan dehidrasi dan selanjutnya terjadi kerusakan pada sel spermatozoa.

Tabel 4. Abnormalitas Spermatozoa Babi Landrace pada berbagai Waktu Ekuilibrasi

Tahapan pengamatan	Waktu ekuilibrasi (jam)		
	1	2	3
Sesudah pengenceran	3,44±0,36	3,44±0,36	3,44±0,36
Sesudah ekuilibrasi	3,46±0,20 ^a	3,51±0,24 ^a	3,60±0,41 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	5,53±1,00 ^a	4,68±0,31 ^a	6,72±0,61 ^b

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Hasil dari penelitian ini tergolong sangat baik jika dibandingkan dengan hasil penelitian Bebas dan Gorda (2020) bahwa abnormalitas spermatozoa babi yang diekuilibrasi selama 2 jam pada suhu 4°C adalah 27,60% dalam pengencer Astaxanthin fosfat kuning telur bebek dengan kadar krioprotektan gliserol sebanyak 4%.

Membran Plasma Utuh Spermatozoa Prad dan Pasca Pembekuan

Keutuhan membran plasma mutlak harus dimiliki oleh spermatozoa supaya terjamin kelangsungan hidupnya dan tercapai keberhasilan pada saat proses fertilisasi. Selain berfungsi untuk melindungi organel-organel yang berada di dalam sel, membran plasma juga berfungsi untuk mengatur keluar masuknya zat-zat makanan serta keseimbangan elektrolit intra maupun ekstraseluler. Spermatozoa yang memiliki membran plasma yang utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung setelah dipaparkan pada larutan hiposmotik menggunakan metode hypoosmotik swelling test

(HOST). Hal ini dapat terjadi karena medium yang masuk ke dalam sel dapat dipertahankan oleh membran plasma yang utuh tersebut. Sebaliknya, membran plasma spermatozoa yang tidak utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang lurus, yang disebabkan oleh adanya medium yang tertahan di dalam sel.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi menunjukkan pengaruh yang tidak nyata (P>0,05) terhadap MPU spermatozoa sesudah ekuilibrasi, tetapi berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap MPU spermatozoa sesudah *thawing*.

Waktu ekuilibrasi 2 jam menghasilkan MPU spermatozoa pasca *thawing* yang lebih tinggi (P<0,05) daripada ekuilibrasi 1 jam dan 3 jam, namun antara ekuilibrasi 1 jam dan 3 jam menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05) (Tabel 5). Hal ini terjadi karena MPU spermatozoa pada waktu ekuilibrasi 2 jam mengalami penurunan yang lebih rendah (27,29%) dibandingkan dengan ekuilibrasi 1 jam (43,28%) dan 3 jam (47,58%).

Tabel 5. Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa babi landrace pada berbagai waktu ekuilibrasi

Tahapan pengamatan	Waktu ekuilibrasi (jam)		
	1	2	3
Sesudah pengenceran	86,23±3,39	86,23±3,39	86,23±3,39
Sesudah ekuilibrasi	81,37±5,21 ^a	81,55±6,17 ^a	83,58±3,74 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	42,95±5,21 ^a	58,94±12,60 ^b	38,65±9,14 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

Tingginya MPU spermatozoa pasca *thawing* pada waktu ekuilibrasi 2 jam diduga karena gliserol telah secara optimal masuk ke dalam membran plasma sel dan mengikat gugus fosfolipid sehingga mampu mengatasi ketidakstabilan membran.

Pada waktu ekuilibrasi, gliserol akan memasuki sel spermatozoa untuk menggantikan sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrasi yang lebih lama kemungkinan gliserol akan bersifat toksik sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa. Akibat

efek toksik dari gliserol, maka membran plasma spermatozoa akan mengalami modifikasi struktur dan mengakibatkan terganggunya transport aktif zat-zat yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa seperti glukosa, asam amino dan asam lemak (Aku *et al.*, 2007). Akibat terganggunya mekanisme ini, spermatozoa akan kekurangan energi sehingga viabilitas serta motilitasnya juga ikut menurun.

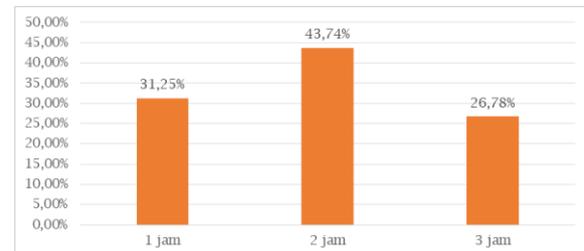
Hasil dari penelitian sedikit lebih tinggi daripada yang dilaporkan oleh Bebas dan Gorda (2020), dimana MPU spermatozoa ternak babi yang diekuilibrasi selama 2 jam pada suhu 4°C adalah sebesar 53,80% dalam pengencer Astaxanthin fosfat kuning telur bebek dengan kadar krioprotektan gliserol sebanyak 4%.

Recovery Rate Spermatozoa

Recovery rate (RR) merupakan kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa pasca thawing dengan motilitas semen segar (Garner dan Hafez (2000). *Recovery rate* merupakan salah satu indikator penting untuk menilai suatu keberhasilan dalam kriopreservasi semen. Selain itu, RR juga menunjukkan efisiensi dari proses pembekuan yang dilakukan. Semakin tinggi nilai RR, maka proses pembekuan yang dilakukan semakin baik.

Rerata RR spermatozoa tertinggi dihasilkan pada waktu ekuilibrasi 2 jam yaitu

43,74%, diikuti oleh waktu ekuilibrasi 1 jam yaitu 31,25%, dan terendah pada waktu ekuilibrasi 3 jam yakni 26,78% (Gambar 1). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap RR spermatozoa.



Gambar 1. *Recovery Rate* Spermatozoa Babi Landrace

Tingginya RR pada waktu ekuilibrasi 2 jam tersebut menandakan bahwa jumlah spermatozoa pasca thawing yang motil juga tinggi. Hal ini berkaitan dengan tingkat keutuhan membran plasma spermatozoa yang mendukung proses metabolisme untuk menghasilkan pergerakan spermatozoa secara baik. Jika motilitas menurun, maka RR juga akan menurun. Pernyataan ini didukung oleh pernyataan Suherlan *et al.* (2015) bahwa tingginya RR bergantung pada jumlah spermatozoa yang motil progresif.

SIMPULAN

Disimpulkan bahwa waktu ekuilibrasi tidak memengaruhi kualitas spermatozoa pra-pembekuan, namun berpengaruh terhadap

kualitas spermatozoa pasca-pembekuan, dengan waktu ekuilibrasi terbaik untuk mempertahankan kualitas semen beku babi landrace adalah 2 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati F, Yulnawati, Riyadi M, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(4): 930-934.
- Aku AS, Sandiah N, Sadsoeitoeboen PD, Amin MR, Herdis. 2007. Manfaat Lesitin Nabati pada Preservasi dan Kriopreservasi Semen: Suatu Kajian Pustaka. *Animal Production* 9(1): 49-52.
- Ardana I, Putra D. 2008. Ternak Babi (Manajemen Reproduksi, Produksi Dan Penyakit). Udayana University Perss.
- Arifiantini R. 2012. Teknik Koleksi Dan Evaluasi Semen Pada Hewan. PT. Penerbit IPB Press.
- Arifiantini R, Ferdian F. 2006. Tinjauan aspek morfologi dan morfometri spermatozoa kerbau rawa (*Bubalus bubalis*) yang dikoleksi dengan tekni masase. *Jurnal Veteriner* 7(2): 83-91.
- Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Hafez B, Bellin M. 2000. Semen Evaluation. (B. Hafez & E. Hafez (eds.); 7th ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
- Bag S, Joshi A, Rawat P, Mittal J. 2001. Effect of Initial freezing temperature on the

- semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Research* 43: 23-29.
- Bearden H, Fuquay J, Willard S. 2004. Applied Animal Reproduction (6th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Bebas W, Gorda W. 2020. Kadar Krioprotektan gliserol dan dimethylsulfoxide terbaik pada pengencer astaxanthin fosfat kuning telur bebek terhadap kualitas semen beku babi. *Jurnal Veteriner* 21(1): 115-123.
- Best B. 2006. Viability, Cryoprotectants toxicity and chilling injury in cryonics. <https://www.benbest.com/cryonics/viable.html>.
- Febriani G, Hamdan, Melia J. 2014. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) setelah thawing. *Jurnal Medika Veterinaria* 8(1): 1-3.
- Feka W, Dethan A, Beyleto V. 2016. Pengaruh lama waktu penyimpanan terhadap viabilitas dan pH semen babi landrace yang diencerkan menggunakan bahan pengencer sitrat kuning telur. *Journal of Animal Science* 1(3): 34-35.
- Feradis M. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak (1st ed.). Alfabeta.
- Foeh NDFK. 2015. Kualitas semen beku babi dalam pengencer BTS dan MIII menggunakan krioprotektan dimethylacetamide dan gliserol dengan sodium dodecyl sulphate. Institut Pertanian Bogor.
- Foeh NDFK, Arifiantini RI, Yusuf TL. 2017. The quality of boar frozen semen diluted in bts® and mii® with different cryoprotectant supplemented with sodium dodecyl sulphate. *Jurnal Kedokteran Hewan* 11(1): 6-10.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96-109.
- Herdis, Rizal M. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Rineka Cipta.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 143-172.
- Kaka A. 2020. Karakteristik dan daya fertilitas spermatozoa babi peranakan landrace. *Jurnal Peternakan Indonesia* 22(3): 277-283.
- Knox R. 2006. Semen Processing, Extending & Storage For Artificial Insemination In Swine. Departement of Animal Sciences University of Illinois Publications, 1-7.
- Kostaman T, Utama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing boer pada pengencer tris-sitrat-fruktosa. *Jurnal Sains Veteriner* 1(24): 58-64.
- Naing SW, Wahid H, Azam KM, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 122(1-2): 23-28.
- Nalley WM, Handarini R, Yusuf TL, Purwantara B, Semiadi G. 2011. The effect of glycerol concentration in Tris glucose egg yolk extender on the quality of Timor Deer frozen semen. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 36(2): 91-96.
- Pangestu M. 2002. Preservation of spermatozoa: methods and applications. indonesian forum on reproduction. *Journal on Reproduction* 1(2): 55-56.
- Parker J. 2000. Reproductive Physiology In Poultry (E. Hafez (ed.)). Lippincott Williams & Wilkins.
- Salamon S, Maxwell W. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 77-111.
- Sangma TFM, Kutubuddin A, Mitali DC, Galib UZ, Nekibuddin A, Arunoday D. 2020. Characteristics of fresh crossbred Hampshire boar semen. *Haryana Veterinarian* 59(1): 98-101.
- Subrata I, Artiningsih N, Sumardani N, Putra W, Umiarti A. 2014. Pengaruh bahan pengencer biologis terhadap kualitas semen babi Hampshire. *Prosiding. Fakultas Peternakan Universitas Udayana*.
- Suherlan NE, Soeparna, Hidajat K. 2015. Pengaruh penambahan berbagai tingkat DMF (dimethylformamide) sebagai agen krioprotektan terhadap keutuhan membran plasma dan recovery rate semen beku domba lokal. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 4(4): 1-12.
- Sumardani N. 2007. Viabilitas dan fertilitas spermatozoa dalam modifikasi pengencer BTS dan zorlesco dengan penyimpanan berbeda dalam rangkaian inseminasi buatan pada babi. *Thesis*. Institut Pertanian Bogor.

- Sumardani N, Budaarsa K, Putri TI, Puger AW. 2019. Umur memengaruhi volume semen dan motilitas spermatozoa babi landrace di Balai Inseminasi Buatan Baturiti, Tambanan, Bali. *Jurnal Veteriner* 20(3): 324-329.
- Sumardani N, Tuty L, Siagian P. 2008. Viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer BTS (Beltsville Thawing Solution) yang dimodifikasi pada penyimpanan berbeda. *Media Peternakan* 31(2): 81-86.
- Surachman M, Herdis, Yulnawati, Rizal M, Maheshwari H. 2009. Kualitas semen cair asal epididimis kerbau belang dalam bahan pengencer andromed yang mendapat penambahan sukrosa. *Media Peternakan* 32(2): 88-94.
- Umar S, Maharani M. 2005. Pengaruh berbagai waktu ekuilibrasi terhadap daya tahan sperma sapi limousin dan uji kebuntingan. *Jurnal Agribisnis Peternakan* 1(1): 17-21.
- Yusuf T, Arifiantini R, Dapawole R, Nalley WM. 2017. Kualitas semen beku babi dalam pengencer komersial yang disuplementasi dengan trehalosa. *Jurnal Veteriner* 18(1): 69-75.