

PENGARUH PERBEDAAN WAKTU EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU BABI LANDRACE DALAM PENGECER DURASPERM MODIFIKASI DENGAN AIR BUAH LONTAR

(Effect of different equilibration time on the quality of landrace boar frozen semen on modification diluent durasperm with palmyra juice)

Maria G. Mega*, **Wilmientje M. Nalley**, **Aloysius Marawali**, **Henederiana L. L. Belli**
Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Kelautan, dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana
Jln. Adisucipto, Penfui, Kupang, Nusa Tenggara Timur, Indonesia 850001

*Correspondent author, email: rastimega1999@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh lama waktu ekuilibrasi terhadap kualitas spermatozoa dan mendapatkan waktu ekuilibrasi yang optimal dalam proses kriopreservasi semen babi landrace. Semen diperoleh dari seekor babi landrace berumur 2-3 tahun yang dikoleksi menggunakan teknik glove gland method. Semen dievaluasi secara mikroskopis dan makroskopis. Semen berkualitas baik diencerkan dalam pengencer dasar, selanjutnya di holding time selama dua jam pada suhu 27-28oC. Semen kemudian disentrifugasi 2000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang dan pellet diencerkan kembali dalam pengencer dasar dengan perbandingan 1:1. Kemudian, semen diencerkan dengan pengencer perlakuan yaitu durasperm modifikasi + 6% laktosa + 4% gliserol dengan konsentrasi 500 x 106/0,5 mL. Selanjutnya, semen dikemas dalam straw 0,5 ml, kemudian di ekuilibrasi pada suhu 3-5oC sesuai perlakuan, yakni perlakuan 1 jam ekuilibrasi (P1), 2 jam ekuilibrasi (P2) dan 3 jam ekuilibrasi (P3). Setelah ekuilibrasi, straw dibekukan 5 cm di atas permukaan N2 cair selama 10 menit pada suhu ±-110 oC dan simpan dalam container N2 cair -196oC. Untuk menguji semen beku dilakukan dengan cara tempatkan semen beku pada suhu 37oC selama 30 detik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas spermatozoa yang tertinggi (P<0,05) terdapat pada P2 dan P3 bila dibandingkan dengan P1 (P>0,05), dengan nilai motilitas P2 : 28,13±2,39%; P3 : 25,00±4,08%; dan P1 18,15±3,23%. Dapat disimpulkan bahwa waktu ekuilibrasi 2 jam dan 3 jam mampu mempertahankan kualitas semen beku babi landrace dan secara statistik tidak berbeda nyata.

Kata-kata kunci: kriopreservasi, ekuilibrasi, semen, babi landrace

ABSTRACT

An experiment was carried out to recognize the effect of long equilibration time on the quality of spermatozoa and to obtain optimal equilibration time in the process cryopreservation of landrace pig semen. Semen was obtained from a landrace boar aged 2-3 years using glove hand method. The semen was then evaluated macroscopically and microscopically, good quality semen was diluted in a basic diluent, than kept for two hours at a temperature of 27-28oC. The semen were then centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes, the supernatant was discarded and the pellets was re-diluted into basic diluent with a ratio of 1:1. Then, semen was diluted in treatment diluent with modified durasperm + 6% lactose + 4% glycerol with a concentration of 500 x 106/0.5 mL. Furthermore, the semen was packaged in 0.5 ml straws, then equilibrated at a temperature of 3-5oC appropriate to treatment, with 1 hour equilibration (T1), 2 hours equilibration (T2) and 3 hours equilibration (T3). After equilibration, the straws was frozen horizontally 5 cm above the liquid N2 vapor for 10 minutes at a temperature of ± -110oC and then stored in a liquid N2 container (-196oC). To test frozen semen, it was done by stored frozen semen at 37oC for 30 seconds. The results showed that the highest quality of spermatozoa (P <0.05) was found in T2 and T3 when compared to T1 (P > 0.05), with the motility value was T2: 28.13 ± 2.39%; T3: 25.00 ± 4.08%; and T1 18,15±3,23%. It can be concluded that 2 hours and 3 hours equilibration time was able to maintain the quality of frozen semen landrace boars and the statistically was not significant.

Keywords: cryopreservation, equilibration, semen, landrace pig

PENDAHULUAN

Kriopreservasi semen merupakan salah satu teknologi di bidang reproduksi, yang bertujuan untuk memaksimalkan pemanfaatan pejantan unggul. Namun, kualitas semen pasca pembekuan masih rendah, hal ini disebabkan karena sperma babi sangat rentan mengalami cold shock saat dipaparkan pada suhu rendah, sehingga mengakibatkan terjadinya kerusakan membran sperma bahkan menyebabkan kematian spermatozoa. Penyebab utama adalah karena, komposisi membran plasma spermatozoa babi lebih tinggi dibandingkan dengan ternak sapi, dimana persentase phosphatidylethanolamine 24% dan sphingomyelin 14%, sedangkan spermatozoa sapi hanya memiliki phosphatidylethanolamine 9,7% dan sphingomyelin 11,5% (White, 1993). Untuk meminimalisir bahkan mencegah kerusakan membran spermatozoa saat pembekuan, dibutuhkan krioprotektan untuk meningkatkan motilitas post thawing spermatozoa babi.

Krioprotektan merupakan suatu zat kimia non elektronik yang berfungsi mereduksi kematian spermatozoa pada proses pembekuan, baik yang berupa efek larutan maupun pembentukan kristal es ekstraseluler dan intraseluler. Krioprotektan yang biasa digunakan adalah gliserol dan beberapa jenis gula seperti glukosa, sukrosa, maltosa, laktosa dan rafinosa. Laktosa merupakan gula disakarida yang efektif dalam menurunkan suhu pembentukan kristal es, dapat mengurangi toksisitas kimia dan

mencegah pemasukan air yang berlebihan kedalam sel (Herdis *et al.*, 2005). Menurut Bebas dan Gorda (2020), konsentrasi gliserol 4% dapat mempertahankan kualitas semen beku babi dengan nilai motilitas pasca thawing adalah $42,60 \pm 1,34\%$.

Waktu ekuilibrase merupakan salah satu metode yang ikut memengaruhi kualitas semen beku. Menurut Bearden *et al.* (2004), ekuilibrase merupakan waktu yang dibutuhkan spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan pengencer sebelum proses pembekuan atau waktu yang dibutuhkan krioprotektan untuk mencapai keseimbangan pada kedua sisi membran plasma, sehingga tingkat kematian spermatozoa dapat diminimalisir dan dapat dicegah. Waktu ekuilibrase 2 jam pada suhu 4-5°C mampu mempertahankan kualitas semen beku babi dibandingkan pada ekuilibrase 4 jam (Passarelli *et al.* 2020), dengan motilitas pasca thawing yang dihasilkan adalah $26,16 \pm 1,54\%$. Sedangkan pada sapi membutuhkan waktu ekuilibrase 4 jam dengan nilai motilitas pasca thawing yang diperoleh $65,10 \pm 4,26\%$ (Arifiantini dan Yusuf, 2010).

Tujuan penelitian ini adalah menguji pengaruh perbedaan waktu ekuilibrase terhadap kualitas semen beku babi landrace dalam pengencer durasperm modifikasi dengan air buah lontar serta mendapatkan waktu ekuilibrase yang optimal dalam proses kriopreservasi semen babi landrace.

METODE PENELITIAN

Persiapan Pengencer Dasar Modifikasi

Durasperm sebanyak 47,51 gram dilarutkan dalam 1000 mL aquabidest dan dihomogen menggunakan stirrer pada spinbar. Sebanyak 80 mL pengencer durasperm dicampur dengan 20 mL kuning telur, kemudian ditambahkan dengan 6 mL air buah lontar dalam 94 mL pengencer durasperm kuning telur. Selanjutnya tambahkan antibiotik penicillin 0,5 mL dan streptomycin 0,4 mL.

Persiapan Pengencer Penelitian

Laktosa sebanyak 0,06 gram (6%), dilarutkan dengan 100 mL pengencer dasar modifikasi. Kemudian ditambahkan 4% gliserol

dalam 96 mL pengencer dasar modifikasi dan laktosa.

Koleksi Semen dan Evaluasi Semen Segar

Penampungan semen dilakukan dengan metode glove hand menggunakan dummy sow yang diperoleh dari seekor babi landrace berumur 2-3 tahun. Semen hasil penampungan langsung dibawa ke laboratorium kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi dan pH. Pengamatan mikroskopis meliputi: motilitas spermatozoa yang merupakan spermatozoa yang bergerak progresif, penilaiannya 0% sampai 100% dengan skala 5%. Konsentrasi spermatozoa dihitung

menggunakan haemocytometer dengan cara menghitung jumlah spermatozoa dalam 5 kamar kecil kemudian dikali 106. Viabilitas spermatozoa dihitung menggunakan zat pewarna differensial eosin-nigrosin. Spermatozoa yang hidup tidak berwarna, sedangkan yang mati ditandai berwarna merah pada bagian kepala. Penilaian abnormalitas spermatozoa ditandai dengan morfologi spermatozoa tidak normal baik abnormalitas primer maupun sekunder. Membran plasma utuh dievaluasi dengan metode hypoosmotic swelling (HOS) test kemudian dievaluasi dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 10 x 40.

Pengenceran Semen

Semen hasil koleksi diencerkan dalam 4 tabung yang berisi pengencer dasar modifikasi dengan perbandingan 1:1, dilakukan secara perlahan-lahan melewati dinding tabung berisi larutan pengencer, kemudian tabung diputar secara perlahan agar pengencer dan semen tercampur homogen. Selanjutnya dilakukan holding time pada suhu 27-28oC selama dua jam. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit, supernatan dibuang dan pellet diencerkan kembali dengan perbandingan 1:1 menggunakan pengencer dasar modifikasi. Selanjutnya semen diencerkan dalam pengencer penelitian yang mengandung gliserol dan laktosa dengan konsentrasi spermatozoa 500 x 10⁶/0,5 mL. Semen yang telah diencerkan dalam pengencer penelitian, selanjutnya dikemas dalam straw 0,5 mL kemudian diberi kode.

Ekuilibrase, Pembekuan dan Pencairan Kembali

Straw yang telah dikemas dalam straw 0,5 mL dan telah diberi kode, selanjutnya disusun dalam rak pembekuan untuk di ekuilibrase pada suhu 3-5oC selama 1, 2 dan 3 jam sesuai perlakuan, yaitu perlakuan 1 jam ekuilibrase

(P1), 2 jam ekuilibrase (P2) dan 3 jam ekuilibrase (P3). Setelah straw yang berisi semen telah di ekuilibrase sesuai perlakuan, straw langsung ditempatkan di atas permukaan uap N₂ cair dengan jarak 5 cm selama 10 menit pada suhu ±-110oC. Setelah 10 menit, straw dicelupkan kedalam N₂ cair. Kemudian straw disimpan dalam kontainer N₂ cair pada suhu -196oC hingga dilakukan evaluasi lebih lanjut. Pengujian kualitas semen setelah pembekuan dilakukan dengan cara dicairkan dalam water bath yang berisi air bersuhu 37oC selama 30 detik.

Variabel Penelitian

Variabel yang diteliti dilakukan pada setiap tahap yaitu pasca pengenceran, pasca ekuilibrase dan pasca thawing yang meliputi: 1) Motilitas spermatozoa ditentukan secara subjektif kuantitatif dengan membandingkan spermatozoa motil bergerak kedepan (progresif) dan tidak progresif pada lima lapang pandang. Penilaiannya terhitung antara 0% sampai 100% dengan skala 5%. 2) Viabilitas spermatozoa dihitung minimal 200 sel dari 10 lapang pandang. Rumus perhitungan viabilitas = (jumlah spermatozoa hidup : total spermatozoa) x 100 %. 3) Abnormalitas spermatozoa dihitung dengan rumus = (spermatozoa abnormal : total spermatozoa) x 100%. 4) Membran plasma utuh dievaluasi dengan metode hypoosmotic swelling (HOS) test. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai ekor lurus. 5) Recovery rate adalah kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan, dengan rumus = (spermatozoa motil setelah thawing : spermatozoa motil semen segar) x 100%.

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan analysis of variance (ANOVA), dilanjutkan dengan Uji Duncan menggunakan software SPSS 20.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen

Volume semen yang diperoleh adalah 109,5±2,52 mL, berwarna putih susu, konsistensinya encer dengan pH 6,63±0,15, yang secara rinci tertera pada Tabel 1.

Hasil ini berbeda dari hasil yang dilakukan oleh Garner dan Hafez (2000), yang menghasilkan volume semen 200-250 mL;

(Bebas dan Gorda, 2020) melaporkan volume 180 mL; dan (Banamtuan *et al.* 2021), melaporkan volume 101,75±20,46 mL. Perbedaan rata-rata volume semen dari berbagai penelitian disebabkan karena jenis ternak, usia, berat badan, frekuensi pengambilan semen, lingkungan dan metode koleksi semen (Sangma *et al.*, 2020). Hasil ini juga tidak berbeda jauh

dengan laporan Yusuf *et al.* (2017), yakni semen berwarna putih-krem dengan konsistensi encer dan pH $6,72 \pm 0,10$; menurut Banamtuan *et al.* (2021), semen yang dihasilkan berwarna putih-krem, konsistensi encer dan pH 6,8; dan Knox (2011), melaporkan semen berwarna putih susu dengan konsistensi encer; Gadea (2003) pH $7,4 \pm 0,2$. Kualitas semen segar yang diperoleh adalah motilitas 70,00%, viabilitas $85,82 \pm 4,45\%$, abnormalitas $3,46 \pm 0,33\%$ dan konsentrasi $270,25 \pm 60,83 \times 10^6/\text{mL}$. Hasil ini tergolong normal, karena standar karakteristik

semen adalah motilitas $\geq 60\%$ dan abnormalitas $\leq 15\%$ (Knox, 2011), viabilitas ≥ 80 (Gadea, 2003) dan konsentrasi 150 – 300 x 106/mL (Garner dan Hafez, 2000). Hasil ini tidak berbeda jauh dari yang dilaporkan Kaka (2020), dimana motilitas $71,67 \pm 5,16\%$ dan viabilitas $79,19 \pm 5,85$, namun lebih tinggi nilai abnormalitas $10,67 \pm 3,27\%$ dan lebih rendah nilai konsentrasi $256,33 \pm 18,99 \times 10^6/\text{mL}$. Sedikit lebih tinggi dari hasil penelitian (Foeh *et al.* 2019), motilitas 80% dan viabilitas $93 \pm 0,7\%$ dan abnormalitasnya $3,5 \pm 1,19\%$.

Tabel 1. Karakteristik semen segar babi landrace

Variabel	Rataan \pm standard deviasi
Volume (mL)	$109,5 \pm 2,52$
Warna	Putih susu
Konsistensi	Encer
pH	$6,36 \pm 0,15$
Motilitas (%)	$70,00 \pm 0,00$
Viabilitas (%)	$85,82 \pm 4,45$
Abnormalitas (%)	$3,46 \pm 0,33$
Konsentrasi (10^6 sel/mL)	$270,25 \pm 60,83$
Membran plasma utuh (%)	$86,65 \pm 4,22$

Perbedaan karakteristik semen segar babi landrace pada setiap penelitian sangat dipengaruhi oleh bangsa, umur, tingkat libido, frekuensi ejakulasi dan lingkungan (Johnson *et al.*, 2000). Sedangkan nilai konsentrasi spermatozoa salah satunya dipengaruhi oleh ukuran lingkaran skrotum, semakin besar ukuran skrotum maka semakin meningkat konsentrasi spermatozoa karena besarnya kandungan hormon testosteron yang berperan merangsang proses spermatogenesis (Saputra *et al.*, 2017).

Nilai membran plasma utuh yang diperoleh adalah $86,65 \pm 4,22\%$, hasil ini tidak berbeda jauh dari penelitian yang dilakukan oleh Sangma *et al.* (2020), yang melaporkan nilai MPU $81,74 \pm 0,45\%$ dan sedikit lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Banamtuan *et al.* (2021),

yakni $90,79 \pm 2,79\%$. Perbedaan nilai membran plasma utuh dipengaruhi bangsa, pola pemeliharaan dan kandungan pengencer (Lubis *et al.*, 2013).

Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Semen Beku Babi Landrace

Berdasarkan hasil analisis, perbedaan waktu ekuilibriasi berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap kualitas semen babi landrace pasca pengenceran dan pasca ekuilibriasi. Hal ini diduga karena pengencer yang digunakan termasuk kategori baik untuk mempertahankan kualitas semen babi landrace pasca pengenceran dan pasca ekuilibriasi sehingga spermatozoa belum mengalami cold shock.

Tabel 2. Motilitas spermatozoa babi landrace

Tahapan pengamatan semen	Waktu ekuilibriasi		
	P1	P2	P3
Pasca pengenceran	$70,00 \pm 0,00^a$	$70,00 \pm 0,00^a$	$70,00 \pm 0,00^a$
Pasca ekuilibriasi	$65,63 \pm 3,75^a$	$62,50 \pm 0,00^a$	$65,63 \pm 2,39^a$
Pasca thawing	$18,75 \pm 3,23^a$	$28,13 \pm 2,39^b$	$25,00 \pm 4,08^b$

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan ($P > 0,05$), P1 : 1 jam ekuilibriasi, P2 : 2 jam ekuilibriasi dan P3 : 3 jam ekuilibriasi

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa, perbedaan waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas pasca thawing spermatozoa babi landrace. Nilai motilitas tertinggi terdapat pada P2 $28,13 \pm 2,39\%$ dan P3 $25,00 \pm 4,08\%$ pasca thawing ($P < 0,05$) sedangkan nilai motilitas terendah terdapat pada P1 $18,75 \pm 3,23$ ($P > 0,05$). Namun, hasil ini masih belum memenuhi standar nasional Indonesia (SNI), yakni nilai motilitas pasca thawing minimal mencapai 40%. Hasil penelitian ini pula lebih rendah dari penelitian yang dilakukan Bebas dan Gorda (2020), yang menghasilkan motilitas $42,60 \pm 1,34\%$ pasca thawing dengan waktu ekuilibrasi 2 jam, namun tidak berbeda jauh dari yang dilaporkan oleh Yusuf *et al.* (2017), bahwa nilai motilitas pasca thawing yang di ekuilibrasi selama 2 jam menghasilkan $21,67 \pm 7,53\%$ - $30,00 \pm 4,47\%$ dan (Passarelli *et al.* (2020), menghasilkan $26,16 \pm 1,54\%$. Hal ini diduga karena perbedaan penggunaan bahan pengencer pada setiap penelitian, sehingga menghasilkan motilitas pasca thawing yang berbeda. Pernyataan ini didukung oleh Solihati dan Kune (2009), yang menyatakan bahwa setiap bahan pengencer memiliki kemampuan yang berbeda dalam mempertahankan kualitas spermatozoa dari bangsa ternak yang sama atau berbeda.

Rataan nilai motilitas hasil penelitian tertinggi yang terdapat pada perlakuan P2 dan P3 pasca thawing ($P < 0,05$), diduga karena konsentrasi gliserol sudah berdifusi kedalam sel spermatozoa secara sempurna sehingga tercapainya keseimbangan konsentrasi elektrolit intra dan ekstra sel. Hal ini juga didukung dengan peranan dari laktosa yang ditambahkan sebagai kombinasi pengencer yang berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa serta dapat menjaga tekanan osmotik dan membantu mengeluarkan air yang berlebihan dalam sel sehingga terjadinya cold shock, pembengkakan sel dan pembentukan kristal sel dapat dihindari.

Menurut Azizah dan Arifiantini (2009), pengontrolan waktu ekuilibrasi selama proses kriopreservasi semen berfungsi untuk memberikan kesempatan pada gliserol agar dapat masuk kedalam sel spermatozoa untuk mengikat sebagian air bebas, sehingga dapat mencegah pembentukan kristal-kristal es dalam medium pengencer selama proses kriopreservasi serta dapat mencegah terjadinya dehidrasi pada spermatozoa.

Rendahnya nilai motilitas spermatozoa pada P1 diduga karena waktu ekuilibrasi yang

relatif singkat, sehingga penyesuaian spermatozoa dengan pengencer belum tercipta secara optimal serta gliserol belum penetrasi secara sempurna kedalam sel spermatozoa. Kondisi ini mengakibatkan spermatozoa mudah mengalami cold shock. Efek cold shock akan merubah membran spermatozoa dari konfigurasi normal ke konfigurasi hexagonal yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa, sehingga kematian spermatozoa pasca thawing meningkat (Morel, 1999).

Kualitas semen beku babi relatif lebih rendah dibandingkan ternak lainnya. Penelitian ini memperoleh motilitas $18,75 \pm 3,23\%$ sampai $28,13 \pm 2,39\%$. Sedangkan motilitas pada ternak sapi $65,10 \pm 4,26$ (Arifiantini dan Yusuf, 2010); pada kerbau lumpur $44,15 \pm 1,70\%$ (Febriani *et al.*, 2014); Kambing $49,54 \pm 9,45\%$ (Kartina, 2014); dan Domba $53,00 \pm 3,69\%$ (Herdis, 2015). Perbedaan ini diduga karena berhubungan dengan komposisi membran plasma yang berbeda antar ternak babi dengan ternak lain, dimana semen babi memiliki phosphatidylethanolamine 24% dan sphingomyelin 14% (Johnson *et al.* 2000), sedangkan semen sapi mengandung phosphatidylethanolamine 9,7% dan sphingomyelin 11,5%. Hal ini mengakibatkan rentanya spermatozoa babi mengalami cold shock pada suhu pembekuan yaitu suhu $\pm 110^{\circ}\text{C}$, yang berakibat pada kerusakan membran plasma semen hingga terjadinya kematian spermatozoa.

Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Semen Beku Babi Landrace

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan waktu ekuilibrasi berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap nilai viabilitas spermatozoa sebelum pembekuan (pasca pengenceran dan pasca ekuilibrasi). Hal ini diduga karena suhu ekuilibrasi $3-5^{\circ}\text{C}$ merupakan suhu yang optimum untuk proses preservasi semen babi. Pernyataan ini didukung oleh (Suryadi, 2016) bahwa spermatozoa yang disimpan pada suhu $3-5^{\circ}\text{C}$ menghasilkan viabilitas $81,62 \pm 7,70\%$.

Rataan nilai viabilitas pasca thawing tertinggi terdapat pada P2 $47,73 \pm 4,57\%$ dan P3 $49,53 \pm 11,44\%$ ($P < 0,05\%$). Hal ini diduga karena gliserol sudah penetrasi secara sempurna kedalam sel spermatozoa sehingga tercapainya keseimbangan konsentrasi elektrolit intra dan ekstra sel serta spermatozoa sudah dapat memanfaatkan semaksimal mungkin

penggunaan laktosa dalam proses glikolisis dan siklus krebs, untuk menghasilkan energi berupa adenosin triphosphate (ATP). Menurut Azizah dan Arifiantini (2009), gliserol dapat mengikat sebagian air bebas dalam sel sehingga tidak terjadinya pembentukan kristal es. Laktosa juga mampu menjaga tekanan osmotik, mengeluarkan air yang berlebihan dari dalam sel, menstabilkan membran sperma dan sebagai

sumber energi (Vishwanath dan Shannon, 2000). Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dari hasil yang dilaporkan oleh (Foeh *et al.* 2017), bahwa waktu ekuilibriasi 2 jam menghasilkan viabilitas $44,84 \pm 0,14 - 52,96 \pm 0,96\%$. Berbeda jauh dari yang dilaporkan oleh Bebas dan Gorda (2020), bahwa waktu ekuilibriasi 2 jam menghasilkan viabilitas $65,80 \pm 1,09\%$; dan $68,20 \pm 2,06\%$ - $70,80 \pm 0,70\%$ (Yusuf *et al.*, 2017).

Tabel 3. Viabilitas spermatozoa babi landrace

Tahap pengamatan semen	Waktu ekuilibriasi		
	P1	P2	P3
Pasca pengenceran	$84,93 \pm 3,70^a$	$84,93 \pm 3,70^a$	$84,93 \pm 3,70^a$
Pasca ekuilibriasi	$82,52 \pm 4,37^a$	$84,93 \pm 6,51^a$	$79,15 \pm 3,27^a$
Pasca <i>thawing</i>	$32,29 \pm 5,05^a$	$47,73 \pm 4,57^b$	$49,53 \pm 11,44^b$

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan ($P > 0,05$), P1 : 1 jam ekuilibriasi, P2 : 2 jam ekuilibriasi dan P3 : 3 jam ekuilibriasi.

Persentase viabilitas terendah terdapat pada perlakuan P1 $32,29 \pm 5,05\%$ ($P > 0,05$), hal ini diduga karena waktu ekuilibriasi yang singkat sehingga gliserol belum sempurna berdifusi masuk ke dalam sel serta spermatozoa belum maksimal memanfaatkan laktosa sebagai sumber energi. Kondisi ini yang menyebabkan spermatozoa mengalami cold shock dan terjadinya pembentukan kristal es yang akan merusak sel spermatozoa saat pembekuan. Menurut Watson (2000), cold shock berpengaruh terhadap perubahan struktur phospholipid membran plasma spermatozoa yang mengakibatkan terlepasnya enzim aspartat-aminotransferase pada mitokondria, sehingga terhambatnya produksi energi dalam bentuk adenosin triphosphate (ATP). Menurut Gao dan Critser (2000), ekuilibriasi yang terlalu cepat mengakibatkan air dalam sel akan keluar dalam jumlah sedikit karena tahap ekuilibrium belum tercapai sempurna. Air yang masih berada dalam sel tersebut akhirnya berubah menjadi es atau intracellular ice formation (IIF) yang akan

merusak sel spermatozoa bahkan kematian spermatozoa.

Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Semen Beku Babi Landrace

Berdasarkan Tabel 4, dapat diketahui bahwa perbedaan waktu ekuilibriasi berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa pasca pengenceran. Namun perbedaan waktu ekuilibriasi pada suhu $3-5^{\circ}\text{C}$ berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa pasca ekuilibriasi. P1 tidak berbeda nyata dengan P2 ($P > 0,05$) serta P1 dan P2 berbeda nyata dengan P3 ($P < 0,05$). Tidak adanya perbedaan yang nyata antara P1 dan P2 disebabkan spermatozoa mengalami cold shock yang diduga karena spermatozoa belum secara sempurna menyesuaikan diri dengan pengencer. Adanya perbedaan yang nyata pada P3 dikarenakan spermatozoa sudah seoptimal mungkin menyesuaikan diri dengan pengencer sehingga spermatozoa belum mengalami cold shock.

Tabel 4. Abnormalitas spermatozoa babi landrace

Tahapan pengamatan semen	Waktu ekuilibriasi		
	P1	P2	P3
Pasca pengenceran	$3,46 \pm 0,25^a$	$3,46 \pm 0,25^a$	$3,46 \pm 0,25^a$
Pasca ekuilibriasi	$3,55 \pm 0,08^a$	$3,71 \pm 0,27^a$	$2,11 \pm 1,29^b$
Pasca <i>thawing</i>	$6,26 \pm 0,80^a$	$4,78 \pm 0,23^b$	$4,85 \pm 0,57^b$

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan ($P > 0,05$), P1 : 1 jam ekuilibriasi, P2 : 2 jam ekuilibriasi dan P3 : 3 jam ekuilibriasi.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan waktu ekuilibriasi berpengaruh

nyata ($P < 0,05$) terhadap abnormalitas spermatozoa pasca *thawing*. Pada perlakuan P2

4,78±0,23% dan P3 4,85 ±0,57% menghasilkan persentase abnormalitas yang relatif rendah dibandingkan P1 6,26±0,80%. Hasil ini diduga karena pada P2 dan P3, spermatozoa sudah secara optimal menyesuaikan diri dengan pengencer dan krioprotektan, sehingga tercapainya keseimbangan konsentrasi cairan ekstra dan intra sel yang mampu mempertahankan tekanan osmotik sel selama pembekuan hingga terjadinya kerusakan selubung lipoprotein dan kerusakan membran sel dapat dihindari. Pernyataan ini sesuai dengan pendapat Herdiawan (2004), bahwa keseimbangan konsentrasi cairan ekstra dan intra sel mampu mempertahankan tekanan osmotik sel, sehingga selubung lipoprotein dan membran sel tidak akan mengalami kerusakan selama pembekuan, kondisi ini yang menyebabkan rendahnya nilai abnormalitas spermatozoa pasca thawing.

Nilai abnormalitas tertinggi terdapat pada perlakuan P1 6,26±0,80, hal ini diduga karena gliserol belum sempurna masuk kedalam sel spermatozoa dan kurang adanya kesempatan laktosa untuk mengeluarkan air yang berlebihan dari dalam sel, sehingga spermatozoa mengalami cold shock, terjadinya pembengkakan sel dan pembentukan kristalisasi es. Hal ini mengakibatkan kerusakan spermatozoa secara mekanik yang berakibat pada tingginya abnormalitas spermatozoa. Proses pendinginan dan pemanasan kembali akan merusak membran yang ada dalam membran plasma, sehingga mengakibatkan keabnormalitan spermatozoa (Ax *et al.*, 2000).

Pengaruh Perlakuan terhadap Membran Plasma Utuh (MPU) Semen Beku Babi Landrace

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan waktu ekuilibriasi berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap membran plasma utuh spermatozoa pasca pengenceran dan pasca ekuilibriasi. Hal ini diindikasikan karena pengencer mampu mempertahankan keutuhan

membran plasma ketika spermatozoa melewati suhu 27 – 28oC dan suhu 3 – 5oC

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan waktu ekuilibriasi berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap membran plasma utuh spermatozoa pasca thawing. Pada perlakuan P2 48,39±4,86% dan perlakuan P3 49,93±11,43% menghasilkan persentase membran plasma utuh yang relatif tinggi dibandingkan P1 32,29±5,05%. Hasil ini tidak berbeda jauh dari penelitian yang dilakukan oleh (Hu *et al.* 2009), yang melaporkan bahwa persentase membran plasma utuh mencapai 44,61%, dengan lama ekuilibriasi 2 jam. Hal ini diduga karena pada perlakuan P2 dan P3, gliserol sudah sempurna masuk kedalam membran plasma, mampu mengikat gugus fosfolipid secara optimal dan terciptanya keseimbangan osmolalitas ekstra dan intra sel sehingga spermatozoa tetap stabil serta mampu memodifikasi struktur permukaan kristal-kristal es menjadi tidak tajam. Laktosa juga sudah secara optimal melindungi membran plasma karena laktosa adalah senyawa pereduksi yang akan menetralkan kerja hidrogen peroksida sehingga dapat merusak ikatan ganda asam lemak tak jenuh dari fosfolipid bilayer membran plasma spermatozoa, akibatnya membran plasma spermatozoa tetap stabil dan utuh (Tambing *et al.*, 2003).

Rataan nilai membran plasma utuh terendah terdapat pada P1 32,84±4,88% ($P>0,05$), hal ini diduga karena lama ekuilibriasi yang relatif cepat sehingga mengakibatkan besarnya kerusakan pada membran plasma spermatozoa, yang disebabkan karena spermatozoa belum menyesuaikan diri dengan pengencer secara optimal, sehingga ketika melewati proses pembekuan dan proses thawing spermatozoa mengalami cold shock yang berakibat pada kerusakan membran. Spermatozoa yang cold shock akan mengalami peningkatan kontraksi lapisan protein sehingga mantel pelindung sperma pecah atau membran mengalami kerusakan (Jadi *et al.*, 2015).

Tabel 5. Keutuhan membran plasma spermatozoa babi landrace

Tahapan pengamatan semen	Waktu ekuilibriasi		
	P1	P2	P3
Pasca pengenceran	85,93 ± 3,29a	85,93 ± 3,29a	85,93 ± 3,29a
Pasca ekuilibriasi	83,49 ± 4,70a	85,49 ± 6,21a	80,17 ± 3,59a
Pasca thawing	32,84 ± 4,88a	48,39 ± 4,86b	49,39 ± 11,43b

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan ($P>0,05$), P1 : 1 jam ekuilibriasi, P2 : 2 jam ekuilibriasi dan P3 : 3 jam ekuilibriasi.

Pengaruh Perlakuan terhadap Recovery Rate (RR) Semen Beku Babi Landrace

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa, perbedaan waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan terhadap recovery rate semen beku babi landrace, dimana perlakuan P1 berbeda nyata dengan P2 dan P3 sedangkan perlakuan P2 dan P3 tidak berbeda nyata. Hal ini diperjelas dengan rata-rata nilai RR yang diperoleh, yaitu rata-rata RR tertinggi terdapat pada P2 $40,18 \pm 3,41\%$ yang diikuti dengan P3

$35,71 \pm 5,83\%$ ($P < 0,05$) sedangkan rata-rata nilai terendah terdapat pada P1 $26,79 \pm 4,61\%$ ($P > 0,05$). Tingginya nilai RR pada P2 dan P3 diduga karena pada perlakuan P2 dan P3, spermatozoa sudah secara optimal menyesuaikan diri dengan pengencer, sehingga terjadinya cold shock dan kristal es dapat diminimalisir bahkan dapat dicegah.

Menurut Suherlan *et al.* (2015), penilaian recovery rate berfungsi untuk menunjukkan keefisienan proses pembekuan, semakin tinggi nilai RR maka proses pembekuan semakin baik yang berkaitan dengan tingginya keutuhan membran plasma yang mendukung proses metabolisme untuk menghasilkan pergerakan spermatozoa.

SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa waktu ekuilibrasi 2 jam dan 3 jam mampu

mempertahankan kualitas semen beku babi landrace.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini R, Yusuf T. 2010. Developing of trisoy milk diluent for frisian holstein bull frozen semen. *Hayati Journal of Biosciences* 17(2): 91-94.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Hafes B. Bellin, ME. 2000. Semen Evaluation. In: *Reprod in Farm Anim.* Hafes B. Hafes ESE (Ed). 7th ed. Pp. 365–389.
- Azizah, Arifiantini R. 2009. Kualitas semen beku kuda pada pengencer susu skim dengan konsentrasi gliserol yang berbeda. *Jurnal of Veteriner* 10(2): 63-70.
- Banamtuan AN, Nalley WM, Hine TM. 2021. Kualitas semen cair babi duroc dalam pengencer durasperm yang disuplementasi air buah lontar dan sari tebu. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 16(1): 41-48.
- Bearden HJ, Fuquay JW, Willard S. 2004. *Applied Animal Reproduction*, 6th Edition. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey. Pp: 1-456.
- 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(36): 115-123.
- Febriani GD, Hamdan, Melia J. 2014. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) setelah thawing. *Jurnal Medika Veterinaria* 8(1): 1-4.
- Foeh NDFK, Gaina CD, Titong AP, Buta CA, Bei MS. 2019. Daya tahan spermatozoa semen cair babi landrace pada metode penyimpanan berbeda. *Jurnal Kajian Veterine* 7(1): 47-52.
- 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.
- Gadea J. 2003. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research* 1(2): 17-27.
- Gao D, Critser JK. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR Journal* 41(4): 187-196.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In :Hafez B. Hafez ESE (Editor) *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Philadelphia (US). Lippincott E Williams and Wilkins. pp. 96–109.
- Herdiawan I. 2004. Pengaruh laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku domba priangan. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner* 9(2): 98-107.

- Herdis. 2015. Daya motil dan keutuhan membran plasma spermatozoa domba garut (*Ovis aries*) pada penambahan kolesterol dalam pengencer Tris kuning telur. *JSTI*. 17(1): 16-23.
- Herdis, Rizal M, Boediono A, Arifiantini RI, Aku AS, Yulnawati. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 30(4): 229-236.
- Hu J-H, Li Q-W, Li G, Jiang Z-L, Bu S, Yang H, Wang L-Q. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Animal Reproduction Science* 112(1-2): 107-118.
- Jadi ML, Supit MA, Kusumaningrum D, Angi AH. 2015. Evaluasi kualitas semen beku akibat perbedaan metode lama ekuilibrasi dan lama penurunan suhu selama prosesing semen. *Partner* 15(2): 170-177.
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. C. (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.
- Kartina. 2014. Pengaruh lama ekuilibrasi terhadap daya hidup spermatozoa kambing peranakan etawa (PE). *Skripsi*. Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddi, Makassar.
- Knox RV. 2011. Semen Processing, Extending And Storage For Artificial Insemination In Swine. In Departemen of Anumal Science. University of Illinois publications. (pp. 1–7).
- Lubis TM, Dasrul, Thasmi CN, Akbar T. 2013. Spermatozoa after cold storage efektifitas penambahan vitamin C dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap kualitas spermatozoa kambing boer setelah penyimpanan dingin. *Jurnal Sains Pertanian* 3(1): 347-361.
- Morel GCGD. 1999. Artificial Insemination. Cabi Publishing. Wallingford. United Kingdom. (pp. 1–416).
- Passarelli MDS, Pavaneli APP, Ravagnani GM, Martins MP, Pedrosa AC, Martins SMMK, de Alcântara RNR, Rigo VHB, Yasui G, Yeste M. 2020. Effects of different equilibration times at 5° C on boar sperm cryotolerance. *Animal Reproduction Science* 219(10): 106-547.
- Sangma TFM, Ahmed K, Choudhury MD, Galib ZU, Ahmed N, Das A. 2020. Characteristics of fresh crossbred hampshire boar semen. *Haryana Veteriner* 59(1): 98-101.
- Saputra DJ, Ihsan MN, Isnaini N. 2017. Korelasi antara lingkaran skrotum dengan volume semen, konsentrasi dan motilitas spermatozoa pejantan sapi bali. *Jurnal Ternak Tropika*: 18(2): 59-68.
- Solihati N, Kune P. 2009. Pengaruh jenis pengencer terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa semen cair sapi simmental. *Jurnal Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran, Bandung*.
- 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.
- Suryadi. 2016. Daya tahan semen cair babi dalam pengencer BTS yang disuplementasi kuning telur pada suhu penyimpanan berbeda. *Skripsi*. Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi. Peternakan-Fakultas Peternakan-Institusi Pertanian Bogor.
- Tambing SN, Utama IK, Arifiantini RI. 2003. Efektivitas berbagai konsentrasi laktosa dalam pengencer tris terhadap viabilitas semen cair kambing saanen. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 8(2): 84-90.
- Vishwanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 23-53.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60: 481-492.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development* 5(6): 639-658.
- Yusuf TL, Arifiantini RI, Dapawole RR, Nalley WM. 2017. Kualitas semen beku babi dalam pengencer Komersial yang disuplementasi dengan trehalosa. *Jurnal Veteriner* 18(1): 69-75.