

PENGARUH LAMA EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU BABI DUROC DALAM PENGECER TRIS-MODIFIKASI DENGAN PENAMBAHAN KRIOPROTEKTAN

(Effect of equilibration time on frozen sement quality of the duroc pig in tris diluents modification With the addition of cryoprotectants)

**Biqshierz V.W. Koelima*, Henderiana L.L. Belli, Johnny N. Kihe,
Wilmientje M. Nalley**

Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Kelautan, dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana
Jln. Adisucipto, Penfui, Kupang, Nusa Tenggara Timur, Indonesia 850001

*Correspondent author, email: biqshierzkoelima146@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian bertujuan menguji pengaruh lama waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku babi duroc dalam pengencer tris-kuning telur (T-KT) modifikasi dengan penambahan krioprotektan ekstraseluler. Semen dikoleksi dua kali seminggu menggunakan metode massage dari dua ekor pejantan duroc berumur $\pm 2,5$ tahun, sehat dan sudah terlatih dalam penampungan semen. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 3 perlakuan dan 4 kali ulangan yaitu P1: waktu ekuilibrasi 1 jam, P2: waktu ekuilibrasi 2 jam, P3: waktu ekuilibrasi 3 jam pada suhu 5°C . Parameter yang diamati adalah motilitas, viabilitas, abnormalitas, membran plasma utuh (MPU) dan recovery rate (RR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas, viabilitas, abnormalitas, MPU dan RR nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) pada ekuilibrasi 2 jam ($25,63 \pm 3,15\%$, $55,86 \pm 5,41\%$, $4,92 \pm 0,53\%$, $56,69 \pm 5,64\%$, $36,61 \pm 4,49\%$) dibandingkan dengan ekuilibrasi 1 dan 3 jam ($20,00 \pm 3,54\%$, $39,28 \pm 9,89\%$, $7,93 \pm 0,76\%$, $40,21 \pm 9,39\%$, $28,57 \pm 5,05\%$) dan ($15,00 \pm 4,08\%$, $32,19 \pm 7,0\%$, $8,41 \pm 0,70\%$, $32,71 \pm 7,07\%$, $21,43 \pm 5,83\%$). Disimpulkan motilitas spermatozoa babi duroc dalam pengencer tris-modifikasi pasca ekuilibrasi 2 jam mencapai $64,375\%$ dan $25,63\%$ pasca thawing, tetapi tidak mencapai standar motilitas spermatozoa $\geq 40\%$ untuk inseminasi buatan.

Kata-kata kunci: ekuilibrasi, babi duroc, semen beku

ABSTRACT

The purpose of this study was to test the influence of the equilibration time on the frozen semen quality of duroc pig in modified tris-egg yolk with the addition of extracellular cryoprotectants. Semen is collected twice per week using massage methods from two duroc males aged ± 2.5 years which in good health and have been trained in semen collection. The design used is a completely randomized design with 4 tests and 3 treatments T1: equilibration time of 1 hour, T2: equilibration time of 2 hours, T3: equilibration time of 3 hours at a temperature of 50°C . Observed parameters were motility, viability, abnormality, MPU, and recovery rate (RR). The results showed that motility, viability, abnormalities, MPU, and RR were higher ($P < 0.05$) at 2 hours of equilibration ($25.63 \pm 3.15\%$, $55.86 \pm 5.41\%$, $4.92 \pm 0.53\%$, $56.69 \pm 5.64\%$, $36.61 \pm 4.49\%$) compared to 1 and 3 hours ($20.00 \pm 3.54\%$, $39.28 \pm 9.89\%$, $7.93 \pm 0.76\%$, $40.21 \pm 9.39\%$, $28.57 \pm 5.05\%$) and ($15.00 \pm 4.08\%$, $32.19 \pm 7.0\%$, $8.41 \pm 0.70\%$, $32.71 \pm 7.07\%$, $21.43 \pm 5.83\%$). It was concluded the motility of duroc pig spermatozoa in the tris-modified diluents after 2 hours of equilibration reached 64.375% and 25.63% post thawing, but did not reach the requirement of 40% spermatozoa motility for artificial insemination. It was concluded that the sperm motility of Duroc pig in tris-modified diluent after 2 hours of equilibration reached 64.375% and 25.63% post thawing, but did not reach the standard of 40% spermatozoa motility for artificial insemination.

Keywords: equilibration, duroc pig, frozen semen

PENDAHULUAN

Ternak babi salah satu komoditas ternak untuk dikembangkan. Masyarakat Nusa Tenggara Timur (NTT) umumnya masih

menerapkan sistem pemeliharaan yang tradisional, sehingga produktifitas dan kualitas produk yang dihasilkan masih tergolong rendah. Salah satu upaya peningkatan produktivitas dan perbaikan kualitas genetik adalah menerapkan teknologi inseminasi buatan (IB). Inseminasi buatan pada ternak babi masih menggunakan semen cair, namun menghadapi kendala dalam permintaan disebabkan babi pejantan yang dipelihara terbatas. Antisipasi akan kondisi tersebut perlu dilakukan preservasi maupun kriopreservasi semen.

Masalah yang sering timbul dalam proses kriopreservasi semen adalah spermatozoa mengalami cold shock. Perubahan kondisi intraseluler akibat pengeluaran cairan yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es mengakibatkan kerusakan bahkan kematian spermatozoa. Mengatasi masalah dalam proses kriopreservasi dapat dilakukan dengan cara menambahkan pengencer dan krioprotektan yang tepat dengan menggunakan metode yang tepat.

Salah satu bahan pengencer semen adalah tris kuning telur yang berfungsi sebagai penyangga atau buffer, menstabilkan pH, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (cold shock) yang merupakan larutan yang mengandung fruktosa dan asam sitrat (Hoesni, 1997). Gliserol merupakan krioprotektan intraseluler karena dapat masuk kedalam sel spermatozoa untuk mengikat sebagian air bebas sehingga dapat mencegah pembentukan kristal-kristal es

(Azizah dan Arifiantini, 2009). Penggunaan gliserol dalam proses pembekuan semen babi adalah 3% (Okazaki *et al.*, 2009). Sementara gula merupakan krioprotektan eskraseluler dan sebagai substrat sumber energi, sehingga dapat melindungi dan mempertahankan kualitas spermatozoa dalam proses pembekuan. Gula yang biasa digunakan adalah dextrose, rafinosa, trehalosa, dan sukrosa pada semen domba garut (Rizal *et al.*, 2006).

Metode yang turut memengaruhi keberhasilan kriopreservasi semen babi adalah waktu ekuilibrisasi. Waktu ekuilibrisasi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menyesuaikan atau beradaptasi dengan pengencer, sehingga dapat meminimalisir bahkan mencegah terjadinya kerusakan maupun kematian spermatozoa (Bearden *et al.*, 2004). Waktu ekuilibrisasi 2 jam pada suhu 3-50 C dengan konsentrasi gliserol 4% mampu mempertahankan kualitas semen beku babi dengan motilitas pasca thawing yang diperoleh adalah $42,60 \pm 1,34\%$ (Bebas & Gorda, 2020) sedangkan Yusuf *et al.* (2017) menyatakannya bahwa waktu ekuilibrisasi 2 jam menghasilkan nilai motilitas pasca thawing sebesar $30,00 \pm 4,47\%$.

Berdasarkan gambaran permasalahan tersebut maka dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh lama waktu ekuilibrisasi terhadap kualitas semen beku babi duroc dalam pengencer tris-modifikasi dengan penambahan krioprotektan.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Penelitian menggunakan semen segar yang berasal dari ternak babi duroc jantan sehat dengan kisaran umur 2,5 tahun.

Metode

Penelitian dirancang menggunakan rancangan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga (3) perlakuan dan empat (4) ulangan. Perlakuan yang diaplikasikan adalah P1= waktu ekuilibrisasi satu 1 jam, P2= waktu ekuilibrisasi 2 jam dan P3= waktu ekuilibrisasi 3 jam.

Persiapan Bahan Pengencer

Persiapan kuning telur, cangkang telur dibersihkan menggunakan alkohol, kulit telur

dipecahkan, telur sudah pecah dituangkan ke atas kertas saring kemudian miringkan agar putih telur diserap oleh kertas saring dan pecahkan selaput vitelin pada kuning telur dan masukan kedalam gelas ukur, setelah itu kuning telur siap digunakan.

Persiapan pengencer tris, bahan yang digunakan terdiri dari tris (Hydroxymethyl Aminomethane) sebanyak 3,63 %, asam sitrat 1,99 %, dan fruktosa 0,50 % dilarutkan dalam 100 mL aquabidest. Kemudian 20 mL kuning telur dilarutkan dalam 80 mL pengencer tris, selanjutnya ditambahkan antibiotik penicillin 1,6 mL dan streptomycin 1,4 mL dan minyak zaitun sebanyak 12%.

Pengencer tris-kuning telur yang telah disiapkan ditambahkan sukrosa 2 gram dan gliserol 4% lalu dihomogenkan.

Tahap Evaluasi Semen Segar

Pemeriksaan semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis yang bertujuan untuk mengetahui kualitas semen yang dihasilkan sebagai uji layak atau tidaknya untuk dilanjutkannya ke tahap pembekuan semen. Evaluasi semen segar secara makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi dan pH. Sementara evaluasi secara mikroskopis meliputi: motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi spermatozoa, dan keutuhan membran plasma.

Tahap Pengenceran Semen

Semen hasil koleksi yang sudah dievaluasi, diencerkan dalam pengencer dasar tris-kuning telur dengan perbandingan 1:1. Pengenceran semen dilakukan dengan cara menambahkan semen secara sedikit demi sedikit secara perlahan melewati dinding tabung berisi larutan pengencer. Kemudian tabung digoyang secara perlahan agar semen dalam larutan pengencer tercampur homogen. Setelah pengenceran, dilakukan holding time selama 2 jam pada suhu 25°C sampai 27°C. Setelah holding time selama 2 jam, selanjutnya disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 2000 rpm untuk memisahkan supernatant dan pellet.

Tahap Pembekuan

Semen hasil sentrifus (pellet) diencerkan kembali dengan pengencer dasar tris-kuning telur ditambah dengan krioprotektan gliserol 4% dan minyak zaitun 10%, kemudian dikemas (packaging) ke dalam straw berukuran 0,5 mL dengan konsentrasi 500×10^6 sel/mL. Setelah dikemas, semen diberi label sesuai dengan perlakuan. Selanjutnya diekuilibrasikan pada suhu dingin 3-5°C selama 1 jam, 2 jam dan 3 jam. Setelah diekuilibrasikan semen dievaluasi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan MPU. Setelah itu semen diupayakan pada permukaan N₂ cair berjarak 10 cm selama 10 menit, dan disimpan dalam container N₂ cair.

Tahap Pencairan Kembali (Thawing)

Setelah 24 jam penyimpanan, semen beku dievaluasi kembali. Penentuan kualitas semen hasil pembekuan diketahui dengan cara melakukan pencairan kembali (thawing). Proses thawing yang dilakukan dalam penelitian ini

adalah 1) siapkan waterbath, lalu masukan air hangat pada waterbath, 2) pastikan suhu air dalam waterbath mencapai 37°C dan selalu stabil, yang dilihat dengan menggunakan thermometer, 3) mengeluarkan straw dari dalam container N₂ cair, 4) kemudian langsung celupkan straw dalam waterbath selama 30 detik, 5) selanjutnya dievaluasi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan membran plasma utuh.

Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diteliti dalam penelitian ini meliputi: 1) Motilitas adalah gerakan individual progresif kedepan yang dinilai segera setelah penampungan dan dapat dijadikan sebagai ukuran kemampuan membuahi. Persentase motilitas merupakan perbandingan jumlah spermatozoa yang bergerak aktif dengan total jumlah spermatozoa yang teramati dalam beberapa lapang pandangan. 2) Viabilitas spermatozoa merupakan evaluasi semen yang bertujuan untuk menentukan spermatozoa yang hidup. 3) Abnormalitas spermatozoa, yakni spermatozoa yang abnormal seperti spermatozoa yang tidak memiliki ekor, spermatozoa yang tidak memiliki kepala, kepala kecil, kepala ganda, kepala besar, ekor bercabang dan ekor melingkar. 4) Membran plasma utuh ditentukan dengan menghitung persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh dengan metode hypoosmotic swelling test. Larutan HOST dibuat dengan menggunakan bahan 0,9 g fruktosa 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dalam 100 mL aquabidest. Sebanyak 20 mL larutan hypoosmotic swelling test ditambahkan dengan 0,2 mL semen, kemudian dihomogenkan. Untuk mengamati keutuhan membran plasma utuh dibuat preparat ulas tipis pada objek glass, dan dievaluasi menggunakan mikroskop. 5) Recovery rate (RR) adalah kemampuan spermatozoa setelah pembekuan dengan membandingkan persentase spermatozoa motilitas pada semen segar dengan pasca thawing. Syarat semen yang digunakan memiliki kriteria : motilitas $\geq 75\%$, konsentrasi $\geq 200 \times 10^6$ sel/mL dan abnormalitas $\leq 20\%$ (Johnson *et al.*, 2000).

Analisis Data

Analisis data menggunakan sidik ragam, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan bila perlakuan berbeda nyata ($P < 0,05$) sesuai petunjuk Steel dan Torrie (1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Babi Duroc

Karakteristik semen segar babi duroc yang diperoleh dari penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1. Rataan Volume Semen yang diperoleh adalah $167 \pm 19,84$ mL. Volume semen yang diperoleh berbeda dengan hasil pengamatan yang dilakukan oleh Sumardani *et al.*, (2008) berkisar 200-250 mL; serta Waluwansa *et al.*, (2019) 240-320 mL. Lebih lanjut bahwa hasil penelitian ini seperti nampak

pada Tabel 1, tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sumardani *et al.*, (2008), yakni warna putih susu-krem, derajat keasaman 7,4 dan Waluwansa *et al.*, (2019), melaporkan semen berwarna putih dengan pH $6,78 \pm 0,13$. Perbedaan hasil yang diperoleh dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain variasi umur, tingkat rangsangan, frekuensi ejakulasi serta kualitas pakan Sangma *et al.*, (2020).

Tabel 1. Kualitas semen segar babi duroc

Variabel	Rerata \pm SD
Volume semen (mL)	167.5 \pm 19.84
Warna semen	Putih Susu-Krem
pH semen	6.55 \pm 0.17
Motilitas sperma (%)	70 \pm 0.00
Viabilitas sperma (%)	85.07 \pm 5.87
Konsentrasi sperma (10^6 sel/mL)	367 \pm 84.94
Abnormalitas sperma (%)	3.62 \pm 0.53
MPU sperma (%)	86.02 \pm 5.93

Pengamatan mikroskopis spermatozoa segar babi duroc diketahui motilitas spermatozoa $70 \pm 0.00\%$, viabilitas 85.07 ± 5.87 , konsentrasi spermatozoa $367 \pm 84.94 \times 10^6$ sel/mL, dan abnormalitas spermatozoa $3.62 \pm 0.53\%$. Hasil ini sesuai dengan pendapat Patmawan *et al.* (2020) yang menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa $\geq 50\%$, konsentrasi spermatozoa ≥ 200 juta sel/mL dan abnormalitas spermatozoa $\leq 20\%$, namun sedikit berbeda dari hasil penelitian Waluwansa *et al.* (2019) melaporkan motilitas $77,0 \pm 2,73\%$, viabilitas $82,26 \pm 2,61\%$, konsentrasi $346 \pm 34,97 \times 10^6$ sel/mL dan abnormalitas mencapai $3,7 \pm 0,68\%$.

Rataan nilai membran plasma utuh (MPU) yang dihasilkan adalah $86.02 \pm 5.93\%$. Hasil ini tergolong normal, karena Solihati *et al.* (2018)

menyatakan bahwa semen yang memenuhi kriteria dengan motilitas minimal 60-90%, abnormalitas spermatozoa kurang dari 15% dan membran plasma utuh diatas 60% akan diproses lebih lanjut untuk proses pengenceran semen.

Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Motilitas Semen Beku Babi Duroc

Nilai motilitas spermatozoa pasca pengenceran dalam penelitian ini adalah 68.75 ± 2.5 % dan pasca ekuilibrasi berkisar antara 61.875 ± 1.25 - $64.375 \pm 3.75\%$. Hal ini mengindikasikan pengencer yang digunakan mampu melindungi semen babi ketika disimpan pada suhu ruang (27 - 28°C) sehingga kematian spermatozoa tidak terlalu tinggi pada proses ekuilibrasi.

Tabel 2. Rataan motilitas spermatozoa semen beku babi duroc (%)

Perlakuan (jam)	Pasca pengenceran	Pasca ekuilibrasi	Pasca thawing
P1	68.75 ± 2.5^a	$64,375 \pm 3,75^a$	$20,00 \pm 3,54^{ab}$
P2	68.75 ± 2.5^a	$64,375 \pm 3,75^a$	$25,63 \pm 3,15^b$
P3	68.75 ± 2.5^a	$61,875 \pm 1,25^a$	$15,00 \pm 4,08^a$

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Hasil analisis statistik memperlihatkan bahwa perbedaan lama waktu ekuilibrasi berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas semen babi duroc pasca thawing.

Persentase motilitas tertinggi $25.63 \pm 3.15\%$ pasca thawing diperoleh pada P2 (ekuilibrasi 2 jam) diikuti dengan P1 (ekuilibrasi 1 jam) sebesar $20.00 \pm 3.54\%$ dan nilai terendah terdapat

pada P3 (ekuilibrasi 3 jam) sebesar 15.00±4.08%. Hasil ini masih belum memenuhi ketentuan standar nasional Indonesia (SNI), yakni nilai motilitas pasca thawing ≥40%. Hal ini diduga karena, pengencer yang digunakan belum sempurna melindungi spermatozoa dari pengaruh cold shock, sehingga tingkat kematian spermatozoa sangat tinggi.

Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa perlakuan P2 (2 jam ekuilibrasi) berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan P1 dan P3 dan perlakuan P1 Hal ini diduga karena spermatozoa sudah beradaptasi secara sempurna dengan pengencer. Gliserol sudah berdifusi secara sempurna ke dalam sel spermatozoa menyebabkan konsentrasi elektrolit ekstra dan intra sel seimbang sehingga pembentukan kristalisasi es dapat dicegah. Hal ini juga diduga karena adanya penambahan sukrosa yang merupakan sumber energi bagi spermatozoa. Surachman *et al.* (2008) melaporkan bahwa sukrosa dalam pengencer dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler sehingga melindungi membran plasma sel dari kerusakan secara mekanis yang mungkin terjadi saat proses pendinginan atau pembekuan. Salamon dan Maxwell (2000) menyatakan bahwa keseimbangan konsentrasi elektrolit ekstra dan intra sel sangat dibutuhkan spermatozoa pada proses pembekuan semen untuk menghindari terjadinya pembentukan kristal es dan mencegah terjadinya cold shock yang berlebihan. Hasil penelitian ini hampir sama dari yang dilaporkan

Yusuf *et al.* (2017) bahwa motilitas spermatozoa babi pasca thawing dengan waktu ekuilibrasi 2 jam dalam pengencer BTSg (Beltsville Thawing Solution dengan gliserol 4%) dan MIIIgT (MIII dengan gliserol 4% dan trehalose 100 nM) menunjukkan motilitas yang relatif sama yaitu 24,17±9,17% dan 26,67±8.16%.

Rendahnya rata-rata nilai motilitas yang rendah terdapat pada P1 yakni 20.00±3.54%, diduga karena ekuilibrasi 1 jam relatif terlalu singkat sehingga spermatozoa belum secara sempurna beradaptasi dengan pengencer. Hal ini mengakibatkan pada saat pembekuan spermatozoa mudah mengalami cold shock yang menyebabkan motilitas spermatozoa menurun drastis. Sementara 3 jam ekuilibrasi yang menghasilkan motilitas terendah yakni 15.00±4.08%, diduga karena waktu ekuilibrasi yang relatif lama yang mengakibatkan munculnya sifat toksik dari gliserol. Dampak munculnya sifat toksik dari gliserol akan mempengaruhi nilai motilitas yang rendah dan pada prosesnya ada kerusakan struktur membran plasma dan organel-organel sel sehingga metabolisme energi terhambat, asupan energi yang tidak ada akan mengakibatkan spermatozoa mati (Febriani *et al.* 2014).

Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Viabilitas Semen Beku Babi Duroc

Rataan viabilitas spermatozoa semen beku babi duroc disajikan dalam Table 3.

Tabel 3. Rataan viabilitas spermatozoa semen beku babi duroc (%)

Perlakuan (jam)	Pasca pengenceran	Pasca ekuilibrasi	Pasca thawing
P1	85.41±5.33 ^a	84.55±5.47 ^a	39.28±9.89 ^{ab}
P2	85.41±5.33 ^a	84.54±6.04 ^a	55.86±5.4 ^b
P3	85.41±5.33 ^a	82.64±3.30 ^a	32.19±7.03 ^a

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Nilai viabilitas spermatozoa pasca pengenceran dalam penelitian ini adalah 85.41±5,33%, pasca ekuilibrasi berkisar antara 82,64±3,30-84.55±5.47% dan pasca thawing 32.19±7.03-55.86±5.41%

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan lama waktu ekuilibrasi berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap viabilitas semen babi duroc pasca pengenceran dan pasca ekuilibrasi, namun berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) pasca thawing. Toelihere (1993) mengemukakan bahwa secara umum pengencer mengandung sumber energi untuk kelangsungan

hidup spermatozoa, unsur penyangga, tidak bersifat meracuni spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk proses preservasi maupun proses kriopreservasi.

Rataan viabilitas tertinggi yang diperoleh pada P2 55.86±5.41% diduga waktu ekuilibrasi 2 jam, spermatozoa mampu beradaptasi secara baik dengan pengencer, serta gliserol sudah masuk ke dalam sel spermatozoa sehingga konsentrasi elektrolit ekstra dan intra sel sudah seimbang, dampaknya pembentukan kristalisasi es dapat dihindari dan dicegah. Menurut Azizah dan Arifiantini (2009), bahwa gliserol dapat

mengikat sebagian air bebas dalam sel spermatozoa sehingga tidak terjadinya pembentukan kristalisasi es, jika waktu ekuilibriumnya sudah mencapai sempurna dengan konsentrasi gliserol yang optimal. Adanya penambahan sukrosa sebagai krioprotektan ekstraseluler juga memberikan dampak yang mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa babi pasca thawing.

Penurunan rata-rata nilai viabilitas yang terjadi pada perlakuan P1 yakni $39.28 \pm 9.89\%$, disebabkan tidak terjadinya proteksi spermatozoa yang optimal oleh gliserol terhadap cekaman dingin, mungkin gliserol belum terdifusi secara optimal ke dalam sel serta spermatozoa belum mampu memaksimalkan pemanfaatan sukrosa sebagai sumber energi. Hal ini mengakibatkan pengencer belum mampu mengurangi pengaruh cold shock yang terjadi selama proses pembekuan dan konsentrasi intraseluler spermatozoa menjadi tidak seimbang, akibatnya kadar air dalam sel spermatozoa meningkat dan pada proses pembekuan terbentuk kristal-kristal es yang dapat merusak selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa (Han *et al.*, 2005).

Rataan nilai viabilitas terdapat pada P3 yakni $32.19 \pm 7.03\%$ relatif sangat rendah dibandingkan dengan perlakuan P1 dan P2, hal ini mengindikasikan waktu ekuilibrasi yang relatif lama yang mengakibatkan munculnya

sifat toksik dari gliserol dan dari penumpukan zat sisa metabolisme. Pernyataan ini didukung oleh Suharman (2016), menyatakan bahwa waktu ekuilibrasi yang lama mengakibatkan terjadinya penumpukan asam laktat dan zat-zat sisa metabolisme yang berakibat toksik bagi spermatozoa, munculnya sifat toksik dari gliserol dan terbentuknya peroksida lipid menyebabkan kerusakan struktur membran spermatozoa. Ekuilibrasi yang terlalu lama juga menyebabkan zat radikal bebas yang berasal dari metabolisme spermatozoa menumpuk dalam larutan semen, sementara fosfolipid membran sel spermatozoa sangat rentan terhadap serangan radikal bebas (Solihati *et al.*, 2018).

Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Abnormalitas Semen Beku Babi Duroc

Rataan abnormalitas spermatozoa semen beku babi duroc disajikan dalam Table 4. Hasil analisis statistik memperlihatkan bahwa pengaruh perbedaan waktu ekuilibrasi tidak memberikan pengaruh nyata ($P > 0,05$) antar perlakuan terhadap abnormalitas semen babi duroc pasca pengenceran dan pasca ekuilibrasi dan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) pasca thawing. Nilai abnormalitas spermatozoa pasca pengenceran dalam penelitian ini adalah $3,19 \pm 0,19\%$ dan pasca ekuilibrasi berkisar antara $4,03 \pm 0,42 - 4,82 \pm 0,40\%$.

Tabel 4. Rataan abnormalitas semen beku babi duroc (%)

Perlakuan (jam)	Pasca pengenceran	Pasca ekuilibrasi	Pasca thawing
P1	$3,19 \pm 0,19^a$	$4,82 \pm 0,40^a$	$7,93 \pm 0,76^b$
P2	$3,19 \pm 0,19^a$	$4,03 \pm 0,42^a$	$4,92 \pm 0,53^a$
P3	$3,19 \pm 0,19^a$	$4,26 \pm 0,71^a$	$8,41 \pm 0,70^b$

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Hal itu disebabkan karena pemberian gliserol pada level optimal mampu mengurangi peningkatan abnormalitas yang terjadi akibat peroksidasi lipid secara bersamaan. Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen mamalia adalah gliserol. Gliserol ini dikenal sebagai krioprotektan intraseluler (Holt, 2000). Gliserol dapat melindungi sel spermatozoa pada bagian dalam pada saat pembekuan dari kristal es yang merusak spermatozoa.

Persentase abnormalitas tertinggi $8,41 \pm 0,70\%$ pasca thawing terdapat pada perlakuan P3 dan diikuti oleh perlakuan P1

sebesar $7,93 \pm 0,76\%$ dan nilai rerata terendah terdapat pada perlakuan P2 sebesar $4,92 \pm 0,53$. Yulianti (2006) menyatakan bahwa peningkatan jumlah spermatozoa yang mengalami abnormalitas diakibatkan oleh pengaruh fisik pada saat perlakuan dimana spermatozoa saling bergesekan satu sama lain sehingga menyebabkan abnormalitas sekaligus kematian. Toelihere (1993) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa dapat terjadi karena tekanan yang keras, pemanasan yang berlebihan dan kontaminasi dengan air, urine atau kuman dan bahan antiseptik.

Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Membran Plasma Uteh Semen Beku Babi Duroc

Rataan membran plasma utuh (mpu) spermatozoa semen beku babi duroc disajikan dalam Table 5.

Berdasarkan data Tabel 5, terlihat jelas bahwa penurunan nilai membran plasma utuh dari pasca pengenceran hingga ke pasca ekuilibrasi relatif sangat rendah. Hal ini diduga karena pengencer tris kuning telur yang dimodifikasi dengan minyak zaitun mampu melindungi spermatozoa dari pengaruh cekaman dingin ketika melewati suhu ruang (27-28oC) saat proses holding time dan pada saat melewati

suhu ekuilibrasi (3-5oC). Pernyataan ini didukung oleh Garner & Hafez (2000) yang melaporkan bahwa semen yang mengandung asam sitrat berguna bagi spermatozoa dan natrium sitrat berfungsi sebagai larutan penyangga dalam pengencer kuning telur. Menurut Waluwaja *et al.* (2019), bahwa pengencer yang mengandung minyak zaitun mampu melindungi spermatozoa dari pengaruh radikal bebas, dikarenakan minyak zaitun mengandung senyawa aktioksidan yakni senyawa golongan polifenol seperti oleuropein dan tyrosol serta hydroxytyrosol berperan dalam melindungi membran plasma.

Tabel 5. Rataan membran plasam utuh semen beku babi duroc

Perlakuan (jam)	Pasca pengenceran	Pasca ekuilibrasi	Pasca thawing
P1	86,45 ± 5,91 ^a	85,49 ± 5,53 ^a	40,21 ± 9,39 ^a
P2	86,45 ± 5,91 ^a	86,28 ± 6,30 ^a	56,69 ± 5,64 ^b
P3	86,45 ± 5,91 ^a	87,67 ± 3,31 ^a	32,71 ± 7,07 ^a

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perbedaan waktu ekuilibrasi berbeda sangat nyata (P<0,01) terhadap keutuhan membran plasma spermatozoa babi duroc pasca thawing. Persentase membran plasma utuh tertinggi 56,69±5,64% pasca thawing terdapat pada P2 diikuti dengan P1 sebesar 40,21±9,39% dan nilai terendah terdapat pada P3 sebesar 32,71±7,07%.

Rataan persentase membran plasma utuh yang tertinggi diperoleh dari perlakuan P2 yakni 55.86±5.41%, hal ini diduga karena spermatozoa sudah beradaptasi secara sempurna dengan pengencer, serta gliserol sudah masuk ke dalam sel spermatozoa sehingga telah terjadinya proteksi spermatozoa yang optimal oleh gliserol terhadap cekaman dingin sehingga konsentrasi elektrolit ekstra dan intra sel sudah seimbang, dampaknya pembentukan kristalisasi es dapat dihindari dan dicegah. Viswanath & Shanon (2000), melaporkan sukrosa dalam pengencer dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler sehingga melindungi membran plasma sel dari kerusakan secara mekanis yang mungkin terjadi saat proses pendinginan atau pembekuan, mengeluarkan air yang berlebihan dari dalam sel serta sebagai sumber energi bagi spermatozoa.

Rendahnya rataan keutuhan membran plasma spermatozoa pasca thawing yang peroleh pada perlakuan P1 40,21 ± 9,39%, diduga

karena belum terjadinya proteksi spermatozoa yang optimal oleh gliserol terhadap cekaman dingin, akibat gliserol belum menyerap secara optimal kedalam sel spermatozoa serta spermatozoa belum mampu memanfaatkan sukrosa sebagai sumber energi dan sebagai krioprotektan ekstraseluler secara sempurna. Hal ini mengakibatkan konsentrasi elektrolit ekstra dan intra sel akibatnya kadar air dalam sel spermatozoa meningkat dan pada proses pembekuan terbentuk kristal-kristal es yang dapat merusak selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa (Azizah & Arifiantini., 2009).

Rendahnya rataan keutuhan membran plasma utuh yang terdapat pada spermatozoa babi yang memperoleh perlakuan P3 32.19±7.03%, diakibatkan karena lamanya relatif lamanya masa waktu ekuilibrasi sehingga menyebabkan terjadinya pemupukan asam laktat dan zat-zat sisa metabolisme yang berakibat toksik bagi spermatozoa dan terbentuknya peroksidasi lipid menyebabkan kerusakan membran plasma spermatozoa (Suharman, 2016).

Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Nilai Recovery Rate Semen Beku Babi Duroc

Recovery rate (RR) adalah kemampuan spermatozoa setelah pembekuan dengan membandingkan persentase spermatozoa motilitas pada semen segar dengan pasca

thawing. Berdasarkan hasil analisis statistik, perbedaan lama waktu ekuilibrisasi berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap recovery rate spermatozoa babi duroc pasca thawing. Persentase recovery rate tertinggi $36.61 \pm 4.49\%$ pasca thawing terdapat pada P2 diikuti dengan P1 sebesar $28.57 \pm 5.05\%$ dan P3 sebesar $21.43 \pm 5.83\%$. Hal ini diduga karena selama 2 jam ekuilibrisasi, spermatozoa sudah mampu menyesuaikan diri dengan pengencer, gliserol sudah penetrasi kedalam sel spermatozoa sehingga konsentrasi elektrolit ekstra dan intra sel seimbang. Dengan adanya penambahan sukrosa sebagai krioprotektan ekstraseluler, karena sukrosa yang merupakan salah satu jenis karbohidrat golongan disakarida sangat berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa serta mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan secara mekanik yang mungkin terjadi pada proses kriopreservasi semen. Menurut Salamon dan Maxwell (2000), gula dalam keadaan beku

berbentuk seperti kaca (glass) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel spermatozoa secara mekanik.

Rendahnya nilai recovery rate yang mendapat perlakuan P1 $28.57 \pm 5.05\%$, diduga karena spermatozoa belum adaptasi secara sempurna dengan pengencer, krioprotektan gliserol dan sukrosa. Hal ini mengakibatkan spermatozoa mudah mengalami cold shock serta terjadinya pembentukan kristalisasi es. Rendahnya nilai recovery rate pada P3 $21.43 \pm 5.83\%$ hal ini diduga karena lamanya waktu ekuilibrisasi sehingga mempengaruhi munculnya toksisitas dari gliserol sehingga mempengaruhi nilai motilitas yang rendah dan pada prosesnya adanya kerusakan struktur membran plasma dan organel-organel sel sehingga metabolisme energi terhambat, asupan energi yang tidak ada akan mengakibatkan spermatozoa mati (Febriani *et al.*, 2014).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian disimpulkan : Disimpulkan motilitas spermatozoa babi duroc dalam pengencer tris-modified pasca ekuilibrisasi 2 jam mencapai

$64,375\%$ dan $25,63\%$ pasca thawing, tetapi tidak mencapai standar motilitas spermatozoa $\geq 40\%$ untuk inseminasi buatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih yang tulus disampaikan kepada Kepala Laboratorium Yayasan Williams dan Laura bersama staf dan teknisi yang telah

memfasilitasi seluruh pelaksanaan penelitian meliputi materi penelitian, bimbingan teknis, fasilitas laboratorium dan penginapan.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, Arifiantini R. 2009. Kualitas semen beku kuda pada pengencer susu skim dengan konsentrasi gliserol yang berbeda. *Jurnal Veteriner* 10(2): 63-70.
- Bearden H, Fuquay J, Willard S. 2004. *Applied Animal Reproduction* (6th ed.). Pearson Prentice Hall.
- Bebas W, Gordas 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.
- Febriani G, Hamdan, Melia J. 2014. Pengaruh waktu ekuilibrisasi terhadap kualitas semen kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) Setelah thawing. *Jurnal Medika Veterinaria* 8(1): 1-4.
- Garner D, Hafez E. 200). Spermatozoa and Seminal Plasma. In B. Hafez & E. Hafez (Eds.), *Reproduction in farm animals* (7th ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Han X, Niu Z, Liu F, Yang C. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *International Journal of Poultry Science* 4(4): 197-201.
- Hoesni F. 1997. Pengaruh kadar kuning telur dalam berbagai pengencer terhadap kualitas spermatozoa domba pasca pembekuan. *Tesis*. Program Pasca Sarjana Universitas Padjadjaran. Bandung.

- Holt W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 3-22.
- Johnson, L., Weitze, K., Fiser, P., & Maxwell, W. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 143-172.
- Okazaki T, Abe S, Shimada M. 2009. Improved conception rates in sows inseminated with cryopreserved boar spermatozoa prepared with a more optimal combination of osmolality and glycerol in the freezing extender. *Journal Animal Science* 80(2): 121-129.
- Patmawan EF, Gaina CD, Foeh ND. 2020. Morfologi abnormalitas spermatozoa babi landrace dan babi duroc dengan pewarnaan carbofuchsin. *Jurnal Veteriner Nusantara* 3(2): 113-119.
- Rizal M, Herdis, Boediono A, Aku A, Yulnawati. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba garut. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner* 11(2): 123-130.
- Salamon S, Maxwell W. 2000. Storage of Ram Semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 77-111.
- Sangma T, Ahmed K, Choudhury M, Zaman G, Ahmed N, Das A. 2020. Characteristics of fresh crossbred hampshire boar semen. *Haryana Veterinarian* 59(1): 98-101.
- Solihati N, Rasad SD, Setiawan R, Nurjanah S. 2018. Pengaruh Kadar Gliserol Terhadap Kualitas Semen Domba Lokal. *Jurnal Biodjati* 3(1): 63.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistik: Suatu Pendekatan Biometrik. Sumantri B. (penerjemah). Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Suharman H. 2016. Kualitas semen beku domba garut (*Ovis Aries*) pada penambahan sukrosa dalam pengencer semen tris kuning telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati* 16(1): 31-38.
- Sumardani N, Tuty L, Siagian P. 2008. Viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer bts (beltsville thawing solution) yang dimodifikasi pada penyimpanan berbeda. *Jurnal Media Peternakan* 31(2): 81-86.
- Surachman M, Herdis, Yulnawati, Rizal M, Maheshwari H. 2008. Kualitas semen cair asal epididimis kerbau belang dalam bahan pengencer andromed yang mendapat penambahan sukrosa. *Media Peternakan* 32(2): 88-94.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa.
- Viswanath R, Shanon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Animal Reproduction Science* 62(1-3): 23-53.
- Waluwanja Y, Nalley WM, Hine TM, Uilly K. 2019. Efektivitas berbagai konsentrasi minyak zaitun ekstra virgin oleum olivae dalam pengencer sitrat kuning telur terhadap kualitas semen cair babi duroc. *Jurnal Nukleus Peternakan* 6(2): 55-62.
- Yulianti ER. 2006. Pengaruh beberapa pengencer dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda terhadap kualitas semen kambing boer sebelum pembekuan. Skripsi. Fakultas Peternakan UB Malang.
- 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.