

**KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BRAHMAN DENGAN DOSIS
KRIOPROTEKTAN GLISEROL YANG BERBEDA DALAM BAHAN
PENGECER TRIS SITRAT KUNING TELUR**

*Brahman Bull's Frozen Semen Quality with Different Doses of Cryoprotectant
Glycerol in Yolk Tris Citrat Diluent*

Nano Setiono^a, Sri Suharyati^b, Purnama Edy Santosa^b

^aThe Student of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

^b The Lecture of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture Lampung University

Soemantri Brojonegoro No.1 Gedung Meneng Bandar Lampung 35145

Telp (0721) 701583. e-mail: kajur-jptfp@unila.ac.id. Fax (0721)770347

ABSTRACT

The research was conducted at the Technical Service Unit Area - Regional Artificial Insemination Center of Lampung, Terbanggi Besar District, Central Lampung Regency, Lampung Province on July 25th to 30th 2014, aims to: 1) determine the effect of different glycerol doses in yolk tris-sitrat diluent on Brahman's frozen semen quality; 2) determine the best glycerol dose which can improve the Brahman bull's frozen semen quality. The design used a completely randomized design with 5 treatments with glycerol doses in the yolk tris-sitrat diluent (5%, 6%, 7%, 8%, 9%) and 3 repetitions. The measured parameters were the percentage of sperm motility and live spermatozoa. The data were analyzed by analysis of variance with the real level 5% or 1% and continued with Orthogonal Polynomials test at significance level 5% or 1%. The results showed the different glycerol doses did not significantly effect ($P>0.01$) against the percentage of sperm motility and live spermatozoa post equilibration, but provides a significant influence ($P<0.01$) against the percentage of sperm motility and live spermatozoa post thawing. Orthogonal polynomials test also showed the different doses of glycerol gives a significant influence ($P<0.01$) against the percentage of sperm motility and live spermatozoa post-thawing. The Effect of different glycerol doses (5%, 6%, 7%, 8%, 9%) of the percentage sperm motility are 35.00%, 37.32%, 32.54%, 20.66%, 1.68% and the percentage of live spermatozoa post-thawing are 44.37%, 55.52%, 50.32%, 38.07%, 9.84%. Based on research results, it proved that 6% glycerol dose is the best dose to maintain the percentage of motility and live spermatozoa post-thawing.

(Keywords: Brahman bull, Glycerol dose, Frozen semen quality, Yolk tris sitrat)

PENDAHULUAN

Teknologi Inseminasi Buatan (IB) atau dikenal dengan istilah kawin suntik pada ternak sapi telah banyak diterapkan di Indonesia. Menurut SNI 4896.1 (2008), IB merupakan salah satu upaya pemanfaatan bibit pejantan unggul secara maksimal dalam rangka perbaikan mutu genetik ternak. Salah satu jenis sapi yang memiliki potensi yang baik dikembangkan adalah sapi Brahman.

Sapi Brahman merupakan sapi yang berasal dari India yang merupakan keturunan dari Sapi Zebu (*Bos Indicus*). Menurut Pane (1990), ciri khas sapi Brahman adalah berpunuk besar dan berkulit longgar, gelambir di bawah leher sampai perut

lebar dengan banyak lipatan- lipatan. Telinga panjang menggantung dan berujung runcing. Sapi ini adalah tipe sapi potong terbaik untuk dikembangkan. Oleh sebab itu, potensi penggunaan semen beku sapi tersebut dapat digunakan sebagai bibit unggul dalam rangka perbaikan mutu genetik sapi di Indonesia.

Keberhasilan IB ditentukan oleh beberapa faktor yaitu keterampilan inseminator, kondisi ternak dan kualitas semen beku. Selama proses pengolahan, kualitas semen beku akan dipengaruhi oleh proses koleksi, pengenceran, pengemasan, dan pembekuan semen. Proses pengenceran memiliki tujuan untuk memperbanyak volume semen; melindungi spermatozoa dari cold shock; menyediakan zat makanan sebagai

sumber energi bagi spermatozoa; menyediakan buffer untuk mempertahankan pH, tekanan osmotik, dan keseimbangan elektrolit; mencegah kemungkinan terjadinya pertumbuhan kuman (Partodihardjo, 1992).

Bahan pengencer yang dapat digunakan untuk semen sapi adalah pengencer tris sitrat kuning telur. Pengencer tris memiliki sifat buffer yang baik, kandungan glukosa yang digunakan sebagai bahan sumber energi dan kandungan kuning telur merupakan sumber asam amino bagi spermatozoa. Pembekuan spermatozoa merupakan proses penghentian kehidupan spermatozoa secara sementara untuk mengurangi proses metabolisme hampir secara total dengan tujuan mengurangi penggunaan energi. Masalah yang ditimbulkan dari proses pembekuan semen adalah stres terhadap cekaman dingin (*cold shock*) dan terbentuknya kristal es akibat proses pengeluaran air secara intraseluler.

Gliserol merupakan bahan pelindung (krioprotektan) yang dapat langsung masuk dan diserap ke dalam sel sperma. Menurut Mumu (2009), penambahan gliserol dalam bahan pengencer memiliki fungsi sebagai bahan pelindung dinding sel karena dapat berdifusi dan di metabolisme sebagai sumber energi (fruktosa). Gliserol dapat memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium sewaktu pembekuan sehingga mampu menghambat kerusakan membran sel secara mekanis pada waktu penurunan suhu (*cooling rate*). Penggunaan dosis gliserol dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur yang tepat dapat memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa. Sampai saat ini belum diketahui dosis gliserol yang tepat untuk pembekuan semen sapi Brahman. Oleh sebab itu, dengan adanya penelitian ini diharapkan memberikan informasi mengenai dosis gliserol yang optimal pada pengencer tris sitrat kuning telur pada semen beku sapi Brahman.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Unit Pelayanan Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah (UPTD-BIBD) Lampung Tengah. Kegiatan penelitian berlangsung pada Juli 2014. Semen yang digunakan berasal dari Sapi Brahman dengan satu kali koleksi.

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima

perlakuan dan tiga ulangan, yaitu G1 (penambahan gliserol 5% dalam bahan pengencer), G2 (penambahan gliserol 6 % dalam bahan pengencer), G3 (penambahan gliserol 7% dalam bahan pengencer), G4 (penambahan gliserol 8% dalam bahan pengencer), G5 (penambahan gliserol 9% dalam bahan pengencer). Data yang diperoleh akan dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan 1% dan apabila berbeda nyata akan dilanjutkan dengan uji Polinomial Ortogonal (Steel dan Torrie 1993).

Prosedur penelitian ini dimulai dengan proses penampungan semen menggunakan vagina buatan dan segera dilakukan evaluasi mikroskopis (volume, warna, konsistensi semen segar dan pH semen) dan makroskopis (motilitas massa, motilitas individu dan konsentrasi sperma) untuk mengetahui kelayakannya. Semen segar yang memenuhi syarat akan diproses lebih lanjut ke tahap pengenceran dengan dosis gliserol yang berbeda. Semen diencerkan dengan menggunakan bahan pengencer tris sitrat kuning telur. Komposisi bahan pengencer tris sitrat kuning telur yang digunakan terdiri dari kuning telur 20 ml, asam sitrat 0,56 g, fruktosa 2,5g, antibiotik (penisilin 0,1 100.000 IU/100ml dan streptomisin 0,1 g), aquabides 80 ml serta gliserol yang berbeda. Proses pembuatan bahan pengencer tris sitrat kuning telur terdiri dari dua tahap yakni pembuatan larutan *stock solution* dan pengenceran. Pembuatan larutan *stock solution* dilakukan dengan cara menambahkan tris aminomethan, citric acid, fruktosa, aquabides dengan dosis yang telah ditentukan. Proses pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan larutan $\pm 74\%$ *stock solution*, $\pm 20\%$ kuning telur, gliserol (dengan dosis yang telah ditentukan), streptomisin dan penisilin. Setelah larutan tercampur, dilakukan pengadukan dengan tujuan untuk menghomogenkan bahan pengencer (BIB Poncowati, 2012).

Setelah proses pengenceran dilakukan ekuilibrasi dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap persentase motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup. Semen selanjutnya dikemas melalui proses filling dan selling. Pengolahan semen dilanjutkan dengan proses pembekuan diawali dengan *prefreezing* dan setelah dilakukan *prefreezing* dilakukan pemeriksaan terhadap persentase motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup. Dilanjutkan dengan proses *freezing* dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan terhadap persentase

motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup setelah *thawing*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi

Berdasarkan evaluasi semen segar, Sapi Brahman dinyatakan dalam kondisi yang baik sehingga dapat dilakukan pengolahan semen lebih lanjut. Hasil evaluasi semen segar disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Evaluasi semen segar Sapi Brahman

Sifat	Nilai
Volume (ml)	11,4
Warna	Putih Susu
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
Konsentrasi sperma (juta/ml)	1.613
Motilitas masa	++
Motilitas individu (%)	70
Spermatozoa hidup (%)	81,33

Hasil evaluasi menunjukkan bahwa volume semen segar yang diperoleh dari hasil penampungan adalah 11,4 ml. Hasil ini menunjukkan bahwa angka yang dihasilkan dalam kondisi yang normal, artinya volume semen tersebut dalam kondisi yang baik. Hal tersebut didukung oleh pendapat Toilehere (1993) yang menyatakan bahwa volume semen sapi jantan berkisar 1--15 ml.

Semen segar yang dihasilkan berwarna putih susu, konsistensi kental dengan bau yang khas. Kondisi tersebut dalam keadaan normal dan sesuai dengan pendapat Toilehere (1993) yang menyatakan bahwa secara normal semen sapi berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Semen yang memiliki bau khas menunjukkan bahwa dalam keadaan normal tanpa adanya kontaminasi akibat bakteri atau penyakit yang menyebabkan bau busuk.

Konsentrasi spermatozoa semen segar adalah 1.613 juta/ml. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Partodihardjo (1992) bahwa spermatozoa per ejakulasi adalah 6 milyar atau konsentrasi per ml adalah 1.200×10^6 . Toilehere (1993) menyatakan bahwa semen sapi dengan konsistensi krem mempunyai konsentrasi 1000--2000 juta sel/ml atau lebih.

Selain itu kebanyakan pejantan yang fertil mempunyai 50 -- 80% spermatozoa yang motil aktif progresif. Hal tersebut sesuai dengan hasil evaluasi motilitas sebesar 70% yang menunjukkan semen segar dalam kondisi yang baik.

Hasil penilaian gerakan masa adalah (++) . Kondisi tersebut dalam keadaan baik karena menurut Toilehere (1993), penilaian gerakan masa (++) menunjukkan bahwa spermatozoa dalam keadaan baik karena terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, jarang, kurang jelas dan agak lamban. Spermatozoa dalam suatu kelompok mempunyai kecenderungan untuk bergerak bersama-sama ke suatu arah merupakan gelombang yang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat tergantung dari konsentrasi sperma hidup di dalamnya gerakan massa spermatozoa yang normal berkisar antara (++) dan (+++).

Jumlah perhitungan persentase spermatozoa hidup adalah 81,33%. Artinya di dalam semen segar yang ditampung terdapat 81,33% spermatozoa yang hidup. Kondisi tersebut menunjukkan semen segar dalam kondisi yang baik karena persentase hidup semen sapi segar yang baik sebesar 60--80% (Hafez, 2000). Selain itu Bearden dan Fuquay (2000) menambahkan bahwa persentase spermatozoa hidup akan selalu lebih tinggi daripada motilitas spermatozoa.

Pengaruh Berbagai Dosis Gliserol Terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa merupakan penentuan kelayakan kualitas spermatozoa setelah pembekuan karena sangat mempengaruhi kemampuan pembuahan sel telur. Nugroho (2003) berpendapat bahwa motilitas atau daya gerak dapat dijadikan patokan dalam menilai kualitas semen. Widiastuti (2001) mengatakan bahwa motilitas atau daya gerak spermatozoa digunakan sebagai penilaian kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur, oleh karenanya motilitas mempunyai peranan yang penting dalam proses fertilisasi. Pada penelitian ini penilaian motilitas spermatozoa selama pembekuan meliputi penilaian setelah ekuilibrase, prefreezing, dan post thawing motility (PTM). Hasil penelitian disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil rata-ran persentase motilitas Sapi Brahman

Perlakuan Gliserol	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrasi	Setelah <i>Prefreezing</i>	<i>Post Thawing Motility</i>
	-----%-----		
5%	53,33 ± 2,89	33,33 ± 2,89	33,33 ± 2,89
6%	58,33 ± 2,89	43,33 ± 2,89	40,00 ± 0,00
7%	56,67 ± 5,00	38,33 ± 2,89	35,00 ± 0,00
8%	51,67 ± 2,89	21,67 ± 2,89	15,00 ± 0,00
9%	46,67 ± 5,77	6,67 ± 2,89	4,33 ± 1,15

Proses ekuilibrasi merupakan tahap yaitu spermatozoa diadaptasikan dengan perubahan kondisi lingkungan yang dingin selama 4 jam pada suhu 5 °C. Sugiarti *et al.*, (2004) menyatakan bahwa proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH. Kondisi tersebut menyebabkan perubahan kondisi asam yang bersifat toksik terhadap spermatozoa. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa dosis gliserol dalam pengencer tris kuning telur tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa selama proses ekuilibrasi. Hal tersebut diduga karena sel belum mengalami cekaman dingin yang berarti, dan perubahan pH akibat metabolisme sel spermatozoa selama proses adaptasi selama 4 jam pada suhu 5 °C. Pada kondisi tersebut gliserol belum dapat dimanfaatkan secara optimal sebagai krioprotektan sel.

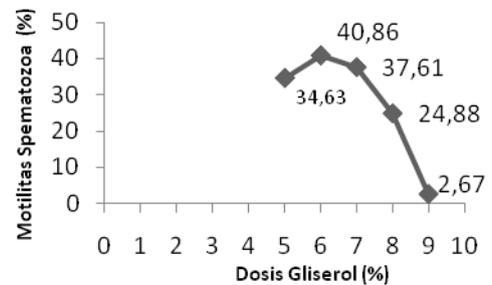
Hasil analisis ragam terhadap motilitas Sapi Brahman setelah *prefreezing* menunjukkan hasil yang berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$). Penambahan dosis gliserol 6% pada *prefreezing* memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa sebesar 43,33% dan hasil ini lebih tinggi jika dibandingkan penambahan gliserol sebanyak 5%, 7%, 8%, dan 9% dengan motilitas 33,33%, 38,33%, 21,67%, dan 6,67%. Uji Polinomial Ortogonal (Gambar 1) menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah *prefreezing* berpola kuadratik dengan persamaan regresi $\hat{Y} = -138,72 + 58,37x - 4,74x^2$ dan memiliki koefisien korelasi (R) sebesar 97% serta koefisien determinan (R^2) sebesar 94%. Nilai R menunjukkan bahwa antara motilitas dengan dosis gliserol memiliki hubungan yang erat sebesar 97%, sedangkan nilai R^2 menunjukkan pada dosis gliserol yang bervariasi memberikan pengaruh sebesar 94%

terhadap motilitas setelah *prefreezing* dan sisanya oleh faktor di luar perlakuan.

$$\hat{Y} = -138,72 + 58,37x - 4,74x^2$$

$$R = 0,97$$

$$R^2 = 0,94$$



Gambar 1. Hubungan antara dosis gliserol dengan persentase motilitas spermatozoa Sapi Brahman setelah *prefreezing*

Perubahan kondisi motilitas spermatozoa selama *prefreezing* disebabkan adanya perubahan suhu yang sangat rendah yaitu -140 °C. Penambahan dosis gliserol 6% pada bahan pengencer tris sitrat kuning telur mampu memberikan perlindungan sehingga pengaruh kerusakan sel akibat cekaman dingin (*cold shock*) dapat dicegah. Penambahan gliserol yang tepat memberikan perlindungan berupa memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk selama proses pembekuan, sehingga kerusakan organel-organel sel spermatozoa dapat dihindarkan (Siswanto, 2006). Pada proses *prefreezing* sel spermatozoa mengalami perubahan suhu yang ekstrim, pada kondisi tersebut gliserol memberikan perlindungan terhadap sel guna mengurangi pembekuan air di dalam sel yang menyebabkan kerusakan sel. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Susilawati (2011), yang menyatakan gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa. Gliserol memiliki peranan mencegah

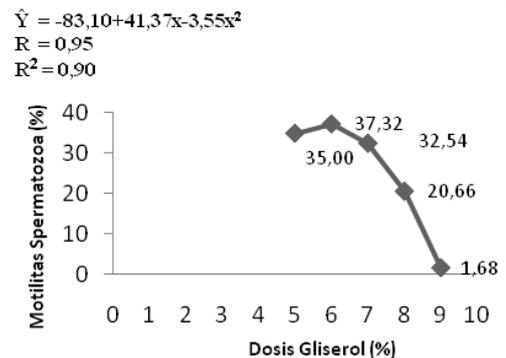
pengumpulan molekul H₂O dan mencegah kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (Mazur, 1980). Selama proses *prefreezing* spermatozoa mengalami proses adaptasi terhadap cekaman yang ditimbulkan oleh perubahan suhu yang sangat rendah. Pada dosis 5% gliserol tidak memberikan pengaruh yang optimal terhadap motilitas spermatozoa. Hal tersebut disebabkan penggunaan dosis yang belum optimal menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Pada dosis 7%, 8% dan 9% gliserol dalam bahan pengencer tris memberikan pengaruh negatif terhadap motilitas spermatozoa. Penurunan motilitas spermatozoa yang digambarkan pada Gambar 1 menunjukkan bahwa dosis gliserol 7%, 8% dan 9% diduga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa selama pembekuan. Pada dosis gliserol 7% dan 8% pengaruh perlakuan menunjukkan motilitas sebesar 37,61% dan 24,88%, namun jika dibandingkan dengan dosis gliserol 9% menunjukkan penurunan motilitas yang sangat ekstrim yaitu berada pada motilitas 2,67%. Kondisi tersebut berarti bahwa dosis gliserol 9% memberikan efek toksik bagi spermatozoa.

Efek toksik yang ditimbulkan berupa perubahan tekanan osmotik larutan di dalam pengencer seiring bertambahnya dosis gliserol. Selama proses pengolahan semen beku dosis gliserol yang berlebih di dalam bahan pengencer diduga menyebabkan perubahan konsentrasi larutan yang menyebabkan perubahan osmolaritas larutan. Akibatnya, terjadi peningkatan tekanan osmotik di dalam sel yang menyebabkan kerusakan membran plasma sel. Tekanan osmotik harus dipertahankan selama proses pembekuan semen karena bila tidak dipertahankan akan mengakibatkan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel berbeda sehingga air akan mengalir ke daerah yang bertekanan osmotik tinggi (Siswanto, 2006). Jika proses tersebut terjadi sel akan mengalami dehidrasi dan menyebabkan kematian sel karena air di dalam sel akan keluar sebagai dampak dari sifat gliserol yang mengikat air serta perubahan osmolaritas larutan. Selain itu, perubahan tekanan osmotik ditandai dengan adanya peningkatan kejadian spermatozoa dengan ekor melingkar, menurunkan viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa (Siswanto, 2006). Kondisi tersebut tentunya menyebabkan gangguan pergerakan sel spermatozoa yang berdampak pada penurunan motilitas.

Hal tersebut bersesuaian dengan pendapat Evan dan Maxwell (1987) yang

melaporkan bahwa, penggunaan gliserol yang dianjurkan 6--8%, jika kurang dari itu maka gliserol tidak akan memberikan efek yang berarti, sedangkan jika lebih tinggi maka akan menimbulkan efek toksik pada spermatozoa. Toksik dapat berupa kerusakan organel sel, gangguan metabolisme, dan kematian sel spermatozoa. Efek toksik diduga menyebabkan respirasi di dalam mitokondria sel menjadi terganggu. Apabila kondisi tersebut terjadi organel sel tersebut akan mengalami kerusakan dan menyebabkan pergerakan sel spermatozoa terganggu karena akibat dari terganggunya metabolisme energi.

Pada PTM hasil analisis ragam menunjukkan pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$). Uji Polinomial Ortogonal penambahan dosis gliserol 6% memberikan pengaruh optimum terhadap persentase motilitas spermatozoa sebesar 40,00%. Hasil ini lebih tinggi jika dibandingkan penambahan gliserol sebanyak 5%, 7%, 8%, dan 9% dengan persentase motilitas 33,33%, 35,00%, 15,00%, dan 4,33%. Hasil penelitian digambarkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hubungan antara dosis gliserol dengan persentase motilitas spermatozoa Sapi Brahman setelah *thawing*

Uji Polinomial Ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah *prefreezing* berpola kuadratik dengan persamaan regresi $\hat{Y} = -83,10 + 41,37x - 3,55x^2$ dan memiliki koefisien korelasi (R) sebesar 95% serta koefisien determinan (R^2) sebesar 90%. Nilai R menunjukkan bahwa antara motilitas dengan dosis gliserol memiliki hubungan yang erat sebesar 95%, sedangkan nilai R^2 menunjukkan pada dosis gliserol yang bervariasi memberikan pengaruh sebesar 90% terhadap motilitas setelah *thawing* dan sisanya

oleh faktor di luar perlakuan. Berdasarkan uji tersebut dosis 5% memiliki nilai motilitas 35% , kemudian meningkat pada dosis 6% dengan nilai motilitas 37,32% namun mengalami penurunan yang sangat rendah pada dosis 8% dengan nilai motilitas 20,66% dan kembali terjadi penurunan yang sangat tajam pada dosis 9% dengan nilai motilitas 1,68%.

Dosis 6% memberikan pengaruh optimum terhadap persentase motilitas spermatozoa jika dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Sinha et al., (1992), tingkatan gliserol sebesar 6% dalam pengencer memberikan persentase motilitas yang lebih tinggi (58,10%) sesudah thawing dibandingkan dengan penambahan gliserol sebesar 5% (57,93%) dan 7% (57,93%). Dosis gliserol yang optimum akan memberikan perlindungan yang efektif pada spermatozoa. Pada proses pembekuan semen, gliserol di dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur mampu mempertahankan kondisi spermatozoa terhadap cekaman dingin dan perubahan tekanan osmotik. Selama proses pembekuan peranan gliserol memberikan perlindungan terhadap sel sehingga organel-organel di dalam sel dapat terhindar dari kerusakan sel selama proses pendinginan. Siswanto (2006) menyatakan peranan lain dari gliserol adalah mencegah terjadinya dehidrasi, karena memiliki daya pengikat air yang kuat. Sifat demikian mempengaruhi tekanan uap sehingga titik beku medium menurun, akibatnya sel spermatozoa akan memperoleh kesempatan lebih lama untuk mengeluarkan air.

Rendahnya motilitas spermatozoa setelah thawing pada dosis gliserol 7%, 8% dan 9% diduga disebabkan efek toksik gliserol. Rizal et al., (2002) berpendapat bahwa konsentrasi gliserol yang berlebihan akan menimbulkan efek toksik pada spermatozoa, sebaliknya apabila kurang, gliserol tidak akan memberikan efek yang optimal. Dosis yang tidak optimum ataupun terlalu tinggi menyebabkan gliserol yang seharusnya dapat melindungi spermatozoa selama proses pembekuan menyebabkan kerusakan sel. Chatterjee et al., (2001) menyatakan pembekuan spermatozoa juga dapat menurunkan viabilitas spermatozoa maupun group sulfidril yang terkandung dalam membran protein spermatozoa sehingga menimbulkan stress fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan fertilitasnya. Pendapat McLaughlin et al.,

(1992) yang mengatakan bahwa efek toksisitas dari gliserol adalah memodifikasi struktur membran plasma dan pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat metabolisme energi. Akibat dari terganggunya mekanisme ini spermatozoa akan mengalami kekurangan energi sehingga viabilitas dan motilitasnya menurun.

Pengaruh berbagai dosis gliserol terhadap spermatozoa hidup selama pembekuan

Hasil analisis ragam menunjukkan tidak adanya pengaruh dosis gliserol terhadap motilitas spermatozoa ($P>0,05$) pada waktu ekuilibrisasi. Dari perlakuan tersebut rata-rata pada motilitas dalam keadaan cukup baik meskipun terjadi penurunan selama proses ekuilibrisasi. Persentase motilitas spermatozoa berada dalam kisaran 52,01--63,41%. Selama proses ekuilibrisasi semen diadaptasikan dengan perubahan kondisi lingkungan yang dingin selama 4 jam pada suhu 5 °C.

Selama proses adaptasi tersebut spermatozoa masih tetap dapat beradaptasi dengan dosis gliserol yang beragam sehingga kerusakan sel spermatozoa masih dapat dicegah. Hal tersebut didukung pendapat Sharma dan Tomar (1984) yang menyatakan penambahan gliserol sebanyak 5%, 7,5% dan 10% ke dalam bahan pengencer susu-glukosa-kuning telur dan susu-glisin-kuning telur tidak berbeda nyata terhadap lama hidup spermatozoa sapi yang disimpan pada suhu 5 °C.

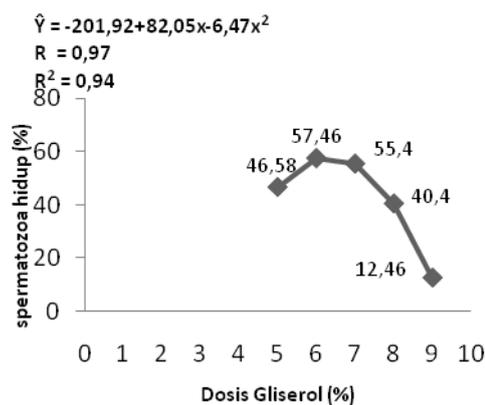
Hasil analisis ragam setelah *prefreezing* menunjukkan dosis gliserol yang berbeda memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P<0,01$) terhadap persentase hidup spermatozoa. Berdasarkan rata-rata persentase spermatozoa hidup berada pada kisaran 12,71-60,78%. Hasil uji Polinomial Ortogonal menunjukkan (Gambar 3) adanya hubungan yang digambarkan dalam grafik pola persamaan regresi berpola kuadrat.

Uji Polinomial Ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah *prefreezing* berpola kuadrat dengan persamaan regresi $\hat{Y} = -187,93 + 77,17x - 6,13x^2$ memiliki koefisien korelasi (R) sebesar 97% serta koefisien determinan (R^2) sebesar 94%. Nilai R menunjukkan bahwa antara motilitas dengan dosis gliserol memiliki hubungan yang erat sebesar 97%, sedangkan nilai R^2 menunjukkan pada dosis gliserol yang bervariasi memberikan pengaruh sebesar 94% terhadap spermatozoa hidup setelah *thawing* dan sisanya oleh faktor di luar perlakuan.

Tabel 3. Hasil rata-rata persentase spermatozoa hidup Sapi Brahman

Perlakuan Gliserol	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrasi	Setelah <i>Prefreezing</i>	<i>Post Thawing Motility</i>
	-----%-----		
5%	54,20 ± 6,03	45,49 ± 2,81	44,37 ± 5,68
6%	63,41 ± 1,92	60,78 ± 4,82	55,52 ± 3,08
7%	61,34 ± 6,92	52,41 ± 7,52	50,32 ± 8,06
8%	53,03 ± 5,16	41,34 ± 2,40	38,07 ± 1,23
9%	52,01 ± 2,20	12,71 ± 1,99	9,84 ± 1,61

Penambahan dosis gliserol 6% yang optimal memberikan pengaruh terhadap persentase spermatozoa hidup sebesar 57,46%. Hasil ini lebih tinggi jika dibandingkan penambahan gliserol sebanyak 5%, 7%, 8%, dan 9% dengan motilitas 46,58%, 55,4%, 40,4%, dan 12,46%. Perubahan lingkungan yang sangat ekstrim selama proses *prefreezing* diduga menyebabkan penurunan persentase spermatozoa hidup. Selama *prefreezing* dosis gliserol 6% memberikan hasil optimal, hal ini di duga karena dosis gliserol mampu memberikan perlindungan yang efektif terhadap *cold shock* jika dibandingkan dengan dosis gliserol lainnya. Selama proses tersebut spermatozoa di bekukan selama 9 menit dalam suhu -140 °C, gliserol didalam pengencer mampu memberikan perlindungan terhadap efek *cold shock*. Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa pada dosis yang optimal sedangkan apabila tidak tepat penggunaannya akan menyebabkan efek yang kurang baik karena dapat bersifat toksik.



Gambar 3. Hubungan antara dosis gliserol dengan persentase spermatozoa hidup Sapi Brahman setelah *prefreezing*

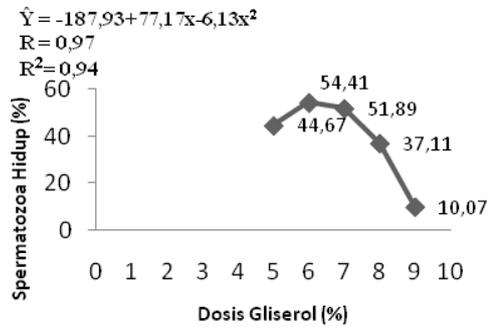
Pada dosis 5% menunjukkan hasil yang rendah jika dibandingkan pada dosis 6%, hal

tersebut disebabkan dosis gliserol yang tidak optimal di dalam bahan pengencer yang menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Selain itu penambahan dosis gliserol yang semakin tinggi cenderung menyebabkan efek toksik. Penurunan kualitas spermatozoa dapat dilihat pada pola penurunan grafik (Gambar 3) pada dosis 7%, 8% dan 9%. Rendahnya spermatozoa hidup pada dosis tersebut diduga disebabkan efek toksik yang ditimbulkan gliserol. Efek negatif yang dapat ditimbulkan gliserol adalah menghambat metabolisme energi dan meningkatnya tekanan osmotik pada pengencer seiring bertambahnya dosis gliserol pada konsentrasi yang tinggi. Perubahan tekanan osmotik menyebabkan adanya perubahan osmolaritas larutan, sehingga terjadi perpindahan air di dalam sel kedalam bahan pengencer karena konsentrasinya yang tinggi. Jika kondisi tersebut berlangsung sel akan mengalami dehidrasi dan mengalami kerusakan membran plasma yang dapat menyebabkan kematian sel. Menurut Toelihere, (1993) gliserol juga dapat merusak struktur membran spermatozoa selama proses pembekuan, menyebabkan cekaman osmotik dan menimbulkan efek negatif terhadap antibiotik di dalam pengencer.

Rataan persentase spermatozoa hidup terhadap dosis gliserol pada (PTM) berada pada kisaran 9,84--55,52%. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa penambahan dosis gliserol memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap persentase spermatozoa hidup. Dosis gliserol memiliki hubungan terhadap spermatozoa hidup setelah thawing yang digambarkan (Gambar 4) pada grafik regresi kuadrat.

Uji Polinomial Ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah thawing berpola kuadrat dengan persamaan regresi $\hat{Y} = -187,93 + 77,17x - 6,13x^2$ memiliki koefisien korelasi (R) sebesar 97% serta koefisien determinan (R^2) sebesar 94%. Nilai R menunjukkan bahwa antara motilitas dengan

dosis gliserol memiliki hubungan yang erat sebesar 97%. Sedangkan nilai R² menunjukkan pada dosis gliserol yang bervariasi memberikan pengaruh sebesar 94% terhadap spermatozoa hidup setelah thawing dan sisanya oleh faktor di luar perlakuan.



Gambar 4. Hubungan antara dosis gliserol dengan persentase spermatozoa hidup Sapi Brahman setelah thawing.

Penambahan dosis gliserol 5% di dalam pengencer tris sitrat kuning telur terhadap spermatozoa hidup menunjukkan nilai 44,67% ,selanjutnya terjadi peningkatan pada pemberian gliserol 6% sebesar 54,41% dan kemudian terjadi penurunan yang cukup tajam pada 7%, 8% dan 9% dengan nilai sebesar 51,89%, 37,11% dan 10,07%. Berdasarkan penelitian ini dosis 6% memberikan hasil yang optimal dalam menjaga daya hidup spermatozoa selama proses pembekuan semen. Hal tersebut diduga peranan gliserol di dalam pengencer tris sitrat kuning telur mampu melindungi sel spermatozoa dari cekaman dingin (*cold shock*) sehingga dampak dari kerusakan sel dapat dicegah. Selain itu gliserol mampu mengikat air sehingga proses kristalisasi air dalam sel dapat dicegah guna mengurangi kerusakan organel sel. Pada dosis 9% persentase spermatozoa hidup setelah thawing sebesar 10,07% , hal tersebut menunjukkan dosis 9% memberikan efek negatif terhadap spermatozoa selama proses pembekuan.

Hal tersebut disebabkan karena dosis gliserol yang terlalu tinggi menyebabkan cekaman osmotik berupa kerusakan membran sel karena perbedaan tekanan antara sel dengan bahan pengencer. Perpindahan air di dalam sel ke bahan pengencer dapat merusak membran sel dan menyebabkan sel mengalami dehidrasi. Akibatnya sel tersebut mengalami kematian karena kerusakan membran sel dan diikuti kerusakan organel sel yang berdampak pada kematian spermatozoa. Dosis gliserol

yang tidak optimal menyebabkan efek negatif terhadap antibiotik di dalam pengencer (Toilehere, 1993).

SIMPULAN

Penambahan dosis gliserol 5%, 6%, 7%, 8% dan 9% dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur berpengaruh sangat nyata terhadap persentase motilitas semen beku Sapi Brahman setelah thawing sebesar 35,00%, 37,32% , 32,54%, 20,66% dan 1,68%.Penambahan dosis gliserol 5%, 6%, 7%, 8% dan 9% dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur berpengaruh sangat nyata terhadap persentase spermatozoa hidup semen beku Sapi Brahman setelah thawing sebesar 44,37%, 55,52%, 50,32%, 38,07% dan 9,84%. Dosis gliserol 6 % merupakan dosis terbaik yang digunakan di dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur.

DAFTAR PUSTAKA

Bearden, H.J. dan J.W. Fuquay. 2000. Applied Animal Reproduction 5th Ed. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey

BIB Poncowati. 2012. Standar Operating Procedure (SOP) Produksi Mani Beku. Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Lampung UPTD Balai Inseminasi Buatan. Lampung.

Chatterjee, S., Smith ER., Hanada K., Stevens VL., Mayor S. 2001. GPI anchoring leads to sphingolipid-dependent retention of endocytosed proteins in the recycling endosomal compartment. EMBO J. 20: 1583--1592.

Evans, G. dan W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat. Sydney: Butterworths.

Hafez, E. S. E.. 2000. Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland.

Mazur, P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. 9th International Congress on Animals Reproduction & AI. Vol I :99--114.

Mclaughlin, E. A., Ford, W. C. L., and Hull, M. G. R. 1992. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. J. Reprod. 95: 527--534.

- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas semen Sapi Simental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Tadulako J. Agroland 16 (2) : 172--179.
- Nugroho, W. E. 2003. Efektivitas konsentrasi kuning telur dan plasma semen pada bahan pengencer tris terhadap kualitas semen beku Saenen. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pane, I. 1990. Upaya Peningkatan Mutu Genetik Sapi Bali. Proceeding Seminar Nasional Sapi Bali. Bali. 20--22 September 1990.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Sumber Widy. Jakarta.
- Rizal, M., Toelihere. M.R., Yusuf. T.L., Purwantara. B., dan Situmorang. 2002. Kaulitas semen beku domba Garut dalam berbagai dosis gliserol. J. Vet. 7 (3): 194-199.
- Sharma, K.B. and N.S. Tomar. 1984. Studies on the effect of glycerol on the keeping quality of bovine semen at 5 °C. Indian Vet. J., 61: 496--500.
- Sinha, S., B.C. Deka, M.K. Tamulu, dan B.N. Borgohain. 1992. Effect of equilibration period and glicerol level in tris extender of quality of frozen goat semen. Indian Vet. J. 69: 1107--1110.
- Siswanto, 2006. Kualitas Semen di dalam Pengencer Tris dan Natrium Sitrat dengan Berbagai Sumber Karbohidrat dan Level Gliserol Pada Proses Kriopreservasi Semen Rusa Timor (*Cervus timorensis*). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- SNI 4896.1. 2008. Semen Beku Sapi. Badan Standarisai Nasional (BSN) : Jakarta. sisni.bsn.go.id/index.php?/sni_main/sni/detail_sni/7026. Diakses pada 5 Maret 2014.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Edisi II Sumantri B, Penerjemah. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sugiarti, T., E. Triwulanningsih, P. Situmorang, R. G. Sianturi dan D. A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan Katalase dalam Produksi Semen Dingin Sapi. Puslitbang Peternakan. Bogor
- Susilawati, T. 2011. Spermatzoatology. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Bandung : Angkasa.
- _____. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. cetakan ke-3. Penerbit Angkasa.. Bandung.
- Widiastuti, E. 2001. Kualitas semen beku sapi FH dengan penambahan antioksidan vitamin C dan E. Skripsi. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.