

Kriopreservasi Semen Domba Garut dengan Pengencer Tris yang Disuplementasi *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*

(CRYOPRESERVATION OF GARUT RAM SEMEN WITH TRIS EXTENDER
ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID)

Muhammad Rizal^{1*}, Herdis², Nasrullah³, Muhammad Riyadhhi¹,
Insun Sangadji⁴, Yulnawati⁵

¹Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Program Studi Peternakan,
Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat,
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36, Banjarbaru 70714.
Telp. 0511-4781551. *E-mail: icang65@yahoo.com

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung II BPPT Lt. 16,
Jl. M.H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat 10340

³Balai Penelitian Ternak, PO. Box 221, Ciawi, Bogor 16002

⁴Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura,
Jl. Ir. M. Putuhena Poka, Ambon 97233

⁵Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia,
Jl. Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

ABSTRAK

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) adalah sebuah stuktur molekuler yang dapat mengikat logam-logam berat dan zat-zat beracun lainnya, sehingga dibutuhkan untuk melindungi spermatozoa dalam proses kriopreservasi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji EDTA dalam mempertahankan kualitas semen beku domba garut. Semen domba garut dikoleksi dengan vagina buatan. Semen segar dievaluasi dan dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan pengencer Tris yang mengandung 20% kuning telur (TKT-20), TKT-20 + 0,01% EDTA (EDTA0,01), dan TKT-20 + 0,02% EDTA (EDTA0,02). Semen dikemas di dalam *straw* mini (0,25 mL) dengan konsentrasi 100 juta spermatozoa motil. Semen diekuilibrasi pada suhu 5°C selama tiga jam, kemudian dibekukan dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair. Kualitas spermatozoa yang dievaluasi meliputi: persentase spermatozoa motil (SM), spermatozoa hidup (SH), dan membran plasma utuh (MPU) dievaluasi setelah tahap pengenceran, ekuilibrasi, dan *thawing*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata volume, warna, konsistensi, pH, gerakan massa, konsentrasi spermatozoa, persentase SM, persentase SH, persentase spermatozoa abnormal, dan persentase MPU semen segar domba garut adalah masing-masing 0,87 mL, krem, kental, 6,98, 3, 4,296 juta sel/mL, 75%, 86,33%, 4,4%, dan 85%. Persentase SM, SH, dan MPU setelah *thawing* pada kontrol (42,5; 52,5; dan 52,17%) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata dengan pada EDTA0,01 (44,17; 52,5; dan 52,5%) dan EDTA0,02 (39,17%; 51%; dan 48,33%). Dapat disimpulkan bahwa penambahan EDTA dalam pengencer Tris dapat mempertahankan kualitas semen beku domba garut, sehingga tetap memenuhi syarat untuk digunakan dalam program inseminasi buatan (IB). Penambahan EDTA tidak dapat meningkatkan kualitas semen beku domba garut.

Kata-kata kunci: kriopreservasi, EDTA, semen beku, domba garut.

ABSTRACT

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) is a molecular structure that binds to heavy metals and other toxins which needed to protect the spermatozoa during the cryopreservation process. The objective of this research was to examine EDTA in maintain the quality of garut ram frozen semen. Semen were collected from mature Garut ram by artificial vagina. Fresh semen were evaluated and divided in equal volume into three tubes and diluted with Tris extender containing 20% egg yolk (TEY-20) as control, TEY-20 + 0.01% EDTA (EDTA0.01), and TEY-20 + 0.02% EDTA (EDTA0.02), respectively. Semen was loaded in

0.25 mL mini straw with the concentration of 100 million motile spermatozoa. Semen was equilibrated at 5°C for three hours, then frozen and stored in liquid nitrogen container. Quality of spermatozoa including percentages of motile spermatozoa (MS), live spermatozoa (LS), and intact plasma membrane (IPM) were evaluated after diluting, equilibrating, and thawing. Data were analyzed using completely randomized design with three treatments and five replicates. Means were compared significant difference test at 0.05 significant level. Results of this research showed that mean volume, color, consistency, pH, mass movement, spermatozoa concentration, percentage of MS, percentage of LS, percentage of abnormal spermatozoa, and percentage of IPM of garut ram fresh semen were 0.87 mL, cream, thick, 6.98, 3, 4,296 million cell/mL, 75%, 86.33%, 4.4%, and 85%, respectively. Percentages of MS, LS, and IPM after thawing in control (42.5, 52.5, and 52.17%) was not significantly difference with EDTA0.01 (44.17, 52.5, and 52.5%) and EDTA0.02 (39.17%, 51%, and 48.33%). In conclusion, the addition of EDTA in Tris extender can maintain quality of Garut ram frozen semen, and its suitable using in artificial insemination program. Addition of EDTA can not enhancing quality of garut ram frozen semen.

Key words: cryopreservation, EDTA, frozen semen, Garut ram.

PENDAHULUAN

Domba garut merupakan salah satu ternak asli Indonesia yang umumnya diternakkan oleh petani-peternak di wilayah Jawa Barat, khususnya daerah Garut, Bandung, Sumedang, Tasikmalaya, Majalengka, Caintur, Sukabumi, dan Bogor. Domba garut memiliki bobot badan yang relatif lebih berat dibandingkan dengan domba lokal Indonesia lainnya. Menurut Rizal dan Herdis (2008) domba garut jantan dewasa memiliki bobot badan sekitar 60–80 kg, bahkan dapat mencapai lebih dari 100 kg, sedangkan domba garut betina dewasa bobotnya sekitar 30–50 kg. Fakta ini menjadikan domba garut potensial dijadikan sebagai donor semen untuk meningkatkan kualitas domba lokal lainnya melalui penerapan teknologi inseminasi buatan (IB).

Proses pengolahan semen baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku merupakan bagian yang tidak terpisahkan dengan aplikasi IB. Tujuan utama pengolahan semen adalah untuk meningkatkan kapasitas jumlah betina yang dapat dilayani setiap ejakulat, serta untuk memperpanjang daya simpan semen yang telah diejakulasikan. Pengolahan semen dalam bentuk semen beku memenuhi kedua tujuan tersebut. Namun, dalam proses pembuatan semen beku, semen memperoleh perlakuan suhu yang sangat ekstrim dan dapat mematikan spermatozoa (Bailey *et al.*, 2000; Medeiros *et al.*, 2002). Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk mencegah terjadinya kematian spermatozoa yang berlebihan selama proses kriopreservasi (pembekuan) semen.

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa

selama proses kriopreservasi adalah dengan menambahkan berbagai jenis zat aditif seperti gula (karbohidrat), vitamin, senyawa antioksidan, dan senyawa yang berfungsi sebagai *chelating agent* (misal *ethylene diamine tetraacetic acid* atau EDTA) ke dalam pengencer. Gula berfungsi sebagai substrat sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler, sehingga dapat melindungi dan menunjang kehidupan spermatozoa selama proses pengolahan (Aboagla dan Terada, 2003; Ahmad dan Aksoy, 2012). Gula telah terbukti mampu memperbaiki kualitas semen beku, seperti sukrosa pada semen beku sapi (Woelders *et al.*, 1997), trehalosa dan EDTA pada domba *pampinta* (Aisen *et al.*, 2000; 2002), serta dekstrosa, rafinosa, trehalosa, dan sukrosa pada domba garut (Rizal *et al.*, 2006).

Ethylene diamine tetraacetic acid adalah sebuah struktur molekuler yang dapat mengikat logam-logam berat dan zat-zat beracun, sehingga dibutuhkan untuk melindungi spermatozoa dalam proses kriopreservasi. Menurut Aisen *et al.*, (2000) EDTA merupakan salah satu senyawa yang berperan sebagai agen krioprotektif, sehingga dapat menekan kerusakan yang terjadi pada spermatozoa akibat pengaruh buruk proses kriopreservasi. Raval *et al.*, (2007) serta Patel dan Shiddiquee (2012) juga melaporkan bahwa penambahan EDTA ke dalam pengencer Tris dapat meningkatkan kualitas semen cair-dingin dan semen beku sapi. Menurut Sansone *et al.*, (2000) secara umum pengencer semen yang baik harus mengandung gula sebagai sumber energi, senyawa krioprotektan sebagai substansi antikejut dingin (*anti-cold shock*) dan melindungi membran plasma sel spermatozoa, dan antibiotik.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas EDTA dalam mempertahankan

kualitas semen domba garut selama proses kriopreservasi. Perbaikan kualitas semen setelah *thawing* diharapkan dapat meningkatkan keberhasilan kebuntingan jika semen tersebut dimanfaatkan dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi, seperti IB.

METODE PENELITIAN

Penampungan dan Pengolahan Semen

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Budidaya Peternakan, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT) di Peternakan Domba Laga Lesan Putra, Bogor. Semen domba garut dewasa yang berumur sekitar empat tahun ditampung menggunakan vagina buatan satu kali dalam satu minggu. Penampungan semen dilakukan sebanyak lima kali sebagai jumlah ulangan.

Semen segar domba garut yang telah ditampung segera dievaluasi untuk mengetahui kualitasnya. Semen yang memenuhi syarat kualitas (spermatozoa motil di atas 70%, gerakan massa ++ atau +++, konsentrasi spermatozoa di atas 2.000 juta/mL, spermatozoa abnormal di bawah 15%), dan persentase membran plasma utuh di atas 60% (Revell dan Mrode, 1994) dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dengan volume yang sama.

Semen pada masing-masing tabung reaksi diencerkan sesuai dengan perlakuan, yakni: pengencer Tris sebagai kontrol, pengencer Tris + 0,01% (0,01 g per 100 mL pengencer) EDTA (EDTA0,01), dan pengencer Tris + 0,02% EDTA (EDTA0,02), hingga mencapai konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per 0,25 mL. Komposisi pengencer dasar Tris terdiri atas: 2,42 g Tris(hidoksimetil)aminometana, 1,28 g asam sitrat, dan 2,16 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata steril hingga mencapai volume 100 mL, kemudian ditambahkan penisilin 1.000 IU/mL dan streptomisin 1.000 IU/mL pengencer (Herdis, 2005). Komposisi pengencer Tris lengkap adalah 75% pengencer dasar Tris ditambah 20% kuning telur ayam ras dan 5% gliserol.

Semen yang telah diencerkan dievaluasi kualitasnya, kemudian dikemas di dalam *straw* mini (0,25 mL) dengan konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per *straw*. Selanjutnya semen yang telah dikemas tersebut diekuilibrasikan di dalam lemari es pada suhu 5°C selama tiga jam. Setelah ekuilibrasikan, setiap sampel semen masing-masing perlakuan dievaluasi kualitasnya.

Pembekuan semen dilakukan dengan cara meletakkan *straw* 10 cm di atas permukaan nitrogen cair di dalam *styrofoam* yang ditutup rapat (suhu sekitar -130°C) selama 15 menit. Selanjutnya *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196°C) dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair. Setelah disimpan selama tujuh hari, setiap sampel *straw* masing-masing perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. Semen beku dicairkan kembali dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik.

Peubah Kualitas Semen yang Dievaluasi

Peubah kualitas spermatozoa yang diamati adalah: persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (MPU) masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*.

Persentase spermatozoa motil adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Spermatozoa motil dievaluasi secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup adalah persentase spermatozoa yang hidup, dan dievaluasi dengan pewarnaan eosin 2% terhadap minimum 200 spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala bening (transparan), sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah.

Persentase MPU adalah persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh, dan dievaluasi dengan metode *hypoosmotic swelling (HOS) test* (Jeyendran *et al.*, 1984). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 1,35 g fruktosa + 0,73 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 µL larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 µL semen dan dicampur hingga homogen, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian dievaluasi dengan bantuan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan

yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan (kontrol, EDTA0,01, dan EDTA0,02) dan setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar Domba Garut

Rataan volume semen yang diperoleh sebanyak 0,87 mL (Tabel 1). Hasil yang diperoleh lebih banyak daripada volume semen domba garut yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya, yakni rata-rata 0,76 mL (Inounu *et al.*, 2001) dan 0,82 mL (Herdis *et al.*, 2005). Pada jenis domba yang lain, dilaporkan bahwa volume semen segar adalah 1,05 mL pada domba *suffolk*, 1,09 mL pada domba *dorset horn*, dan 1,14 mL pada domba *texel* (Boland *et al.*, 1985), 0,9–1,2 mL pada domba (Langford *et al.*, 1989), dan sebanyak 1,1 mL pada domba *konya merino* (Kaya *et al.*, 2002).

Tabel 1. Karakteristik semen segar domba garut

Unsur	Ukuran
Volume (mL)	0,87 ± 0,10
Warna	Krem
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Derajat keasaman (pH)	6,98 ± 0,10
Gerakan massa (1–3)	3,00 ± 0,00
Konsentrasi (juta/mL)	4.296 ± 884
Spermatozoa motil (%)	75,00 ± 0,00
Spermatozoa hidup (%)	86,33 ± 0,82
Spermatozoa abnormal (%)	4,40 ± 1,52
Membran plasma utuh (%)	85,00 ± 1,67

Rataan derajat keasaman semen domba garut yang diperoleh adalah 6,98. Rataan derajat keasaman semen domba garut sebesar 7,07 (Rizal *et al.*, 2003) dan 6,89 (Herdis *et al.*, 2005).

Hasil pengamatan diperoleh bahwa warna, konsistensi, gerakan massa, dan konsentrasi spermatozoa domba garut masing-masing adalah krem, kental, +++, dan 4.296 juta/mL.

Inounu *et al.*, (2001), Rizal *et al.*, (2003), dan Herdis *et al.*, (2005) melaporkan bahwa warna semen segar domba garut adalah krem, konsistensi kental, gerakan massa +++, dan konsentrasi spermatozoa 950–4.368 juta/mL. Konsentrasi spermatozoa semen domba *konya merino* adalah 3.800 juta/mL (Kaya *et al.*, 2002).

Persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup domba garut yang diperoleh adalah masing-masing 75% dan 86,33%. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa rata-rata persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup semen domba garut adalah masing-masing 58,08% (10–80%) dan 64,32% (19–95%) (Inounu *et al.*, 2001), 76,67% dan 87,33% (Rizal *et al.*, 2003) serta 74,17% dan 86,6% (Herdis *et al.*, 2005).

Rataan persentase spermatozoa abnormal domba garut yang diperoleh adalah 4,4%. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa rata-rata persentase spermatozoa abnormal domba garut adalah 5,47% (Rizal *et al.*, 2003) dan 2,67% (Herdis *et al.*, 2005). Rataan persentase spermatozoa abnormal domba *konya merino* adalah 4,8% (Kaya *et al.*, 2002).

Hasil pengamatan diperoleh rata-rata persentase MPU spermatozoa domba garut adalah 85%. Hal ini menunjukkan bahwa semen segar tersebut memenuhi syarat untuk diolah dan dimanfaatkan dalam program IB, karena menurut Revell dan Mrode (1994) persentase MPU semen segar yang kurang dari 60% dikategorikan sebagai semen yang infertil. Peneliti sebelumnya melaporkan bahwa rata-rata persentase MPU domba garut adalah 87,73% (Rizal *et al.*, 2003) dan 85% (Herdis *et al.*, 2005).

Berdasarkan pada data kuantitas dan kualitas semen segar domba garut seperti yang tertera dalam Tabel 1, dapat dikatakan bahwa semen segar domba garut tersebut memenuhi syarat untuk diolah menjadi semen cair atau semen beku. Hal ini karena semen segar domba garut tersebut memiliki rata-rata persentase spermatozoa motil sebanyak 75%, konsentrasi spermatozoa 4296 juta/mL, persentase spermatozoa abnormal 4,4%, dan persentase MPU 85%. Menurut beberapa peneliti, semen segar yang baik harus memiliki persentase spermatozoa motil di atas 70% (Evans dan Maxwell, 1987), persentase spermatozoa abnormal 6–10% (Delgadillo, 1992), dan persentase MPU di atas 60% (Revell dan Mrode, 1994). Domba garut yang digunakan dalam penelitian ini dapat menghasilkan semen segar dengan kualitas yang baik, diduga selain karena

faktor genetik juga karena faktor manajemen pemeliharaan yang baik. Selama penelitian, pejantan domba garut yang digunakan dipelihara dalam kondisi lingkungan dan kesehatan yang baik, serta memperoleh pakan yang berkualitas. Menurut Toelihere (1993) kualitas pakan yang rendah pada jantan, mengakibatkan atrofi testis, penurunan jumlah spermatozoa per ejakulat, dan kehilangan libido.

Kualitas Semen Setelah Proses Kriopreservasi

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penambahan EDTA sebanyak 0,01 dan 0,02 g per 100 mL pengencer Tris tidak memberikan pengaruh yang nyata lebih baik terhadap seluruh variabel kualitas semen setelah *thawing* (Tabel 2). Pada perlakuan penambahan 0,02 g EDTA menghasilkan persentase spermatozoa motil yang nyata lebih rendah dibandingkan dengan penambahan 0,01 g EDTA ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa dosis EDTA yang digunakan dalam percobaan ini adalah tinggi, sehingga cenderung berpengaruh buruk terhadap spermatozoa, walaupun pada perlakuan EDTA0,01 memperlihatkan hasil lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Menurut Soylyu *et al.*, (2007) penambahan zat terlarut seperti karbohidrat dalam jumlah banyak ke dalam pengencer meningkatkan tekanan osmotik pengencer tersebut. Spermatozoa yang berada di dalam larutan bertekanan osmotik tinggi akan menyebabkan

spermatozoa tersebut membengkak, sehingga berpengaruh terhadap kondisi fisiologi, dan bahkan dapat menyebabkan kematian.

Peneliti sebelumnya melaporkan hal yang berbeda dengan hasil penelitian ini. Aisen *et al.*, (2000) melaporkan bahwa penambahan trehalosa dan EDTA secara bersamaan di dalam pengencer semen dapat memperbaiki kualitas semen beku domba *pampinta*, karena trehalosa dan EDTA mampu meminimalkan kerusakan pada spermatozoa selama proses kriopreservasi. Hal ini mungkin karena ada pengaruh yang saling melengkapi antara trehalosa dan EDTA, yang dalam penelitian ini hanya menambahkan EDTA tanpa gula. Menurut Aboagla dan Terada (2003) trehalosa meningkatkan fluiditas membran plasma sel spermatozoa, sehingga kerusakan spermatozoa selama proses kriopreservasi dapat diminimalkan.

Hasil yang berbeda juga dilaporkan pada semen sapi dan manusia, yaitu penambahan 0,1 g EDTA per 100 mL pengencer Tris menghasilkan semen beku sapi (Patel dan Shiddiquee, 2012) dan semen cair-dingin (Raval *et al.*, 2007) dengan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan integritas akrosom yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa penambahan EDTA. Kuo *et al.*, (1998) melaporkan bahwa penambahan EDTA ke dalam pengencer semen manusia dapat meningkatkan persentase spermatozoa motil progresif, sehingga mampu menstimulasi kesuburan pada laki-laki. Hal ini menunjukkan

Tabel 2. Rataan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU semen domba garut setelah pengenceran, ekuilibrisasi, dan *thawing*

Peubah	Perlakuan	Tahap pengolahan semen		
		Setelah pengenceran	Setelah ekuilibrisasi	Setelah <i>thawing</i>
Spermatozoa motil (%)	Kontrol	75,00 ± 0,00 ^a	67,50 ± 2,74 ^a	42,50 ± 2,74 ^{ab}
	EDTA0,01	75,00 ± 0,00 ^a	70,00 ± 0,00 ^a	44,17 ± 4,92 ^b
	EDTA0,02	75,00 ± 0,00 ^a	66,67 ± 2,58 ^a	39,17 ± 3,76 ^a
Spermatozoa hidup (%)	Kontrol	83,00 ± 2,90 ^a	78,17 ± 2,48 ^a	52,50 ± 2,74 ^a
	EDTA0,01	83,00 ± 1,79 ^a	78,33 ± 2,42 ^a	52,50 ± 4,42 ^a
	EDTA0,02	83,33 ± 2,16 ^a	78,50 ± 1,87 ^a	51,00 ± 4,56 ^a
MPU (%)	Kontrol	81,33 ± 0,82 ^a	74,00 ± 2,61 ^a	52,17 ± 4,46 ^a
	EDTA0,01	80,83 ± 1,33 ^a	74,67 ± 2,07 ^a	52,50 ± 1,87 ^a
	EDTA0,02	82,53 ± 1,87 ^a	74,83 ± 2,14 ^a	48,33 ± 1,63 ^a

^{a,b} Superskrip dalam kolom yang sama masing-masing peubah menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)
 EDTA0,01 = 100 ml pengencer Tris + 0,01 g EDTA
 EDTA0,02 = 100 ml pengencer Tris + 0,02 g EDTA
 MPU = membran plasma utuh.

bahwa ada perbedaan spermatozoa antarspesies ternak dalam merespons perlakuan yang diberikan.

Penambahan EDTA sebanyak 0,01% dalam pengencer Tris menyebabkan peningkatan persentase spermatozoa motil semen beku domba garut dibandingkan dengan tanpa penambahan EDTA (44,17% berbanding 42,5%), dan layak digunakan dalam program IB. Berdasarkan pada Standar Nasional Indonesia (SNI 4869.1:2008), semen beku yang memenuhi syarat kualitas digunakan dalam program IB adalah harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%. Pada penambahan EDTA sebanyak 0,02% terjadi penurunan persentase spermatozoa motil semen beku domba garut yang nyata dibandingkan dengan penambahan EDTA sebanyak 0,01% (44,17% berbanding 39,17%; $P < 0,05$). Hal ini mungkin terkait dengan EDTA yang bersifat asam, sehingga pada penambahan dosis yang lebih tinggi akan meningkatkan derajat keasaman (menurunkan pH) pengencer semen. Meningkatnya derajat keasaman pengencer semen akan mengganggu proses metabolisme di dalam sel spermatozoa, sehingga suplai energi berupa adenosin trifosfat (ATP) berkurang yang menyebabkan menurunnya pergerakan (motilitas) spermatozoa dan sekaligus berakibat buruk terhadap daya hidup spermatozoa. Menurut Toelihere (1993) pH sangat memengaruhi daya tahan hidup spermatozoa. Selanjutnya dinyatakan bahwa pH normal semen domba adalah netral.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan EDTA dalam pengencer Tris dapat mempertahankan kualitas semen beku domba garut, sehingga tetap memenuhi syarat untuk digunakan dalam program IB. Penambahan EDTA tidak dapat meningkatkan kualitas semen beku domba garut.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan agar dilakukan penelitian lanjutan untuk menemukan dosis optimum penambahan EDTA dalam proses kriopreservasi semen domba garut, dan sekaligus melakukan uji fertilitas semen beku melalui teknologi IB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada BPPT dan Peternakan Domba Laga Lesan Putra atas bantuan dana, ternak domba, dan fasilitas pendukung sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol Reprod* 69: 1245-1250.
- Ahmad E, Aksoy M. 2012. Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: a mini review. *Animal Health, Production and Hygiene* 1: 123-129.
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- Aisen, EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl* 21: 1-7.
- Boland MP, Al-Kamali AA, Crosby TF, Haynes NB, Howles CM, Kelleher DL, Gordon I. 1985. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido, and plasma hormone concentrations in ram. *Anim Reprod Sci* 9: 241-252.
- Delgadillo JJ, Leboeuf B, Chemineau P. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum Res* 9: 47-59.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. London: Butterworths.
- Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). *Disertasi*. Bogor : Institut Pertanian Bogor.

- Herdis, Rizal M, Boediono A, Arifiantini RI, Saili T, Aku AS, Yulnawati. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J Pengembangan Peternakan Tropis* 30: 229-236.
- Inounu I, Hidajati N, Jarmani SN, Priyanto D, Hastono, Setiadi B, Subandriyo. 2001. Pengaruh interaksi genetik dan lingkungan terhadap produksi domba persilangan dan domba lokal pada beberapa lokasi pengamatan: evaluasi kualitas semen domba persilangan. Di dalam: Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II". Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Hlm 64-73.
- Jeyendran RS, van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.
- Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in ram. *Small Rum Res* 44: 153-158.
- Kuo YL, Tzeng WL, Chiang HK, Ni RF, Lee TC, Young ST. 1998. New system for long-term monitoring of sperm motility: EDTA effect on semen. *Arch Adrol* 41: 127-133.
- Langford GA, Shrestha JNB, Marcus GJ. 1989. Repeatability of scrotal size and semen quality measurements in rams in a short-day light regime. *Anim Reprod Sci* 19: 19-27.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- Patel BR, Siddiquee GM. 2012. Effect of semen diluent additives on spermatozoal viability of kankrej bull semen following cryopres. *Wayamba J Anim Sci* 4: 377-380.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22: 278-283.
- Raval RJ, Dharmi AJ, Parmar BC. 2007. Effect of extender-additives on motility, viability and acrosomal integrity of triplebred (HF x Jersey x Kankrej) bulls' spermatozoa during refrigeration preservation (5 degree Celcius). *The Indian J Anim Sci* 77. Abstract.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36: 77-86.
- Rizal M. 2006. Fertilitas semen beku hasil ejakulasi dan spermatozoa beku asal cauda epididimis domba garut. *J Sain Veteriner* 24: 49-57.
- Rizal M, Herdis. 2008. *Inseminasi Buatan pada Domba*. Jakarta: Rineka Cipta. Hlm 1-6.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2003. Kriopreservasi semen domba garut dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan* 19: 79-83.
- Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* 62: 55-76.
- Soylu MK, Nur Z, Ustuner B, Dogan I, Sagirkaya H, Gunay U, Kemal AK. 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thawed ram semen. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 51: 241-246.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama. Hlm 168-215.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa. Hlm 46-62.
- Woelders H, Matthij A, Engel B. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93-105.