

Daya Tahan Semen Segar dan Kualitas Semen Cair Kuda dengan Konsentrasi Spermatozoa Berbeda dalam Pengencer Dimitropoulos yang Dimodifikasi

YUDI^{*)}, I. ARIFANTINI, B. PURWANTARA dan T.L. YUSUF

*Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor,
Jl. Agathis Kampus IPB Darmaga
Gedung FKH-IPB wing 3 lantai 3, Tlp. 0251 629461
^{*)} Korespondensi: yudi_r@ipb.ac.id, Tlp. 0251. 629461*

(Diterima dewan redaksi 8 Januari 2008)

ABSTRACT

YUDI, I. ARIFANTINI, B. PURWANTARA and T.L. YUSUF. 2008. The viability of fresh and extended semen of stallion with different sperm concentration in Dimitropoulos-modified extender. *JITV* 13(1): 35-42.

The objective of the experiment was to study the motility and viability of spermatozoa of fresh semen, and the quality of extended semen with different sperm concentration in Dimitropoulos-modified extender. Semen was collected using artificial vagina from three 4-8 year old stallions (different breed). Semen characteristics and quality was evaluated macro- and microscopically. For longevity evaluation, semen was stored at room and chilled temperature, and was evaluated for motility and viability every 3 h. Prior extension, semen was centrifugated at 3000 rpm for 20 minutes. The condensed sperm was re-suspended in Dimitropoulos (DV) supplemented with 50 mM fructose with the concentration of 200, 100 and 50 x 10⁶ spz/mL. All samples were stored at room and chilled temperature, and was evaluated for motility and viability every 3 h and 12 h for room and chilled temperature. Results of the experiments indicated that fresh semen characteristics was fairly good. For longevity evaluation, semen with motility of 48,33 and 10,42% was observed at 3 h and 12 h after the onset of storage. The extended-semen with 50 x 10⁶ spz/mL showed significantly higher in term of motility and viability (P<.05) than that with 200 x 10⁶ spz/mL, but for that of 100 x 10⁶ spz/mL. It is recommended that sperm concentration should be 50 x 10⁶ spz/ml for a long period storage with reasonable good quality.

Key words: Stallion, Semen, Sperm Concentration, Dimitropoulos

ABSTRAK

YUDI, I. ARIFANTINI, B. PURWANTARA dan T.L. YUSUF. 2008. Daya tahan semen segar dan kualitas semen cair kuda dengan konsentrasi spermatozoa berbeda dalam pengencer Dimitropoulos yang dimodifikasi. *JITV* 13(1): 35-42.

Penelitian ini bertujuan mengetahui daya tahan semen segar dan cair kuda dengan konsentrasi berbeda dalam pengencer Dimitropoulos-modifikasi. Semen dikoleksi dari 3 ekor kuda (1 ekor G4 Thoroughbred, 1 ekor American Pinto, dan 1 ekor Swedish Warmblood) berumur 4-8 tahun dengan menggunakan vagina buatan. Karakteristik semen segar dievaluasi secara makroskopik dan mikroskopik. Uji daya tahan semen segar dilakukan dengan menyimpan semen dalam tabung tertutup pada suhu ruang dan lemari es, dan dievaluasi motilitas (M%) dan persentase hidup (H%) setiap 3 jam. Pada uji daya tahan semen cair, sebelum diencerkan semen segar disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Selanjutnya plasma dibuang dan pelet dilarutkan dengan pengencer Dimitropoulos yang disuplementasi dengan fruktosa 50 mM sampai konsentrasi 200, 100 dan 50 x 10⁶ sel/mL. Semua perlakuan disimpan dalam tabung tertutup pada suhu ruang dan lemari es, dan dievaluasi M% dan H% setiap 3 jam (suhu ruang) dan 12 jam (lemari es). Hasil penelitian menunjukkan bahwa karakteristik semen segar cukup baik, dengan M% pada 3 dan 12 jam setelah penyimpanan adalah 48,33% dan 10,42%. Pada semen cair, konsentrasi 50 x 10⁶ sel/mL menunjukkan M% dan H% nyata lebih tinggi dibandingkan dengan 200 x 10⁶ sel/mL, baik yang disimpan pada suhu ruang maupun pada lemari es namun tidak berbeda nyata dengan 100 x 10⁶ sel/mL. Hal ini mungkin terkait dengan sumber energi, pH media dan efek negatif spermatozoa mati. Disarankan, agar semen cair bertahan lebih lama sebaiknya disimpan pada konsentrasi 50 x 10⁶ sel/mL.

Kata kunci: Kuda, Semen, Konsentrasi Spermatozoa, Dimitropoulos

PENDAHULUAN

Kuda merupakan salah satu ternak yang banyak dimanfaatkan masyarakat Indonesia, diantaranya sebagai sarana transportasi, olahraga, hiburan, hewan kesayangan dan sumber protein hewani. Di Yogyakarta dan Jawa Tengah banyak masyarakat mengkonsumsi daging kuda karena diyakini dapat menghilangkan pegal linu, mempertinggi daya tahan tubuh dan menambah vitalitas (PUTRO, 2003). Sementara itu, *susu kuda liar* (kuda Sumbawa) yang sudah lama dikonsumsi masyarakat diyakini dapat menyembuhkan kanker, bronkhitis, thipus dan menambah stamina pria (HERMAWATI, 2003). Namun demikian, peternakan kuda di Indonesia hingga saat ini belum mendapat perhatian serius dari pemerintah dan masyarakat. Pengembangbiakannya masih mengandalkan perkawinan secara alam dengan tingkat keberhasilan yang rendah, sehingga populasi kuda terus berkurang.

Hingga tahun 2003, di Indonesia terdapat 11 jenis kuda lokal, yaitu kuda Gayo, kuda Batak, kuda Jawa, kuda Priangan, kuda Sulawesi, kuda Lombok, kuda Bali, kuda Sumbawa, kuda Sandel, kuda Flores dan kuda Timor (SUDARDJAT, 2003). Pada tahun 1997 populasi kuda mencapai 582 300 ekor, sedangkan tahun 2003 sekitar 452 900 ekor, dengan laju penurunan adalah sekitar 22,20% (3,7% per tahun). Penurunan tersebut diduga terkait dengan tingginya angka pemotongan yang didorong oleh kesulitan ekonomi peternak, pengafkiran oleh berbagai sebab, dan rendahnya angka kelahiran. Pada perkawinan secara alam, sering terjadi infeksi setelah perkawinan yang berhubungan dengan anatomi organ reproduksi serta perilaku hidup jantan dan betina (EILTS, 2004).

Usaha meningkatkan populasi kuda di Indonesia perlu terus dilakukan, diantaranya dengan penerapan bioteknologi reproduksi, misalnya inseminasi buatan (IB). Saat ini, IB pada kuda telah dilakukan secara terbatas oleh beberapa peternakan kuda, sebagian menggunakan semen beku impor dan sebagian lain dengan semen cair produksi sendiri. Keberadaan Balai IB, lembaga penelitian peternakan dan perguruan tinggi seyogyanya dapat mempercepat pengembangan kuda lokal melalui program IB. Pelaksananya dapat dilakukan dengan semen cair karena terbukti menghasilkan fertilitas lebih tinggi (MOREL, 1999) dan biaya lebih murah daripada semen beku.

Keberhasilan program IB memerlukan semen yang berkualitas baik. Oleh karena itu proses pengolahannya perlu mendapat perhatian khusus karena karakteristik semen kuda agak berbeda dengan ternak lain. Semen kuda terdiri atas tiga fraksi, yaitu fraksi pra-spermatozoa, fraksi kaya-spermatozoa dan fraksi pasca-spermatozoa. Teknik pengolahan, termasuk pengencer dan tingkat pengenceran, dan jenis karbohidrat sebagai sumber energi dalam media sekaligus sebagai pelindung

spermatozoa (*anti-cold shock*) menjadi penting, karena akan mempengaruhi kualitasnya (TOELIHERE, 1993). Sumber energi dalam media preservasi semen kuda biasanya adalah glukosa, sedangkan pada ternak lain fruktosa (MOREL, 1999). Namun demikian, penambahan beberapa disakarida dan oligosakarida mampu mempertahankan kualitas semen cair dan beku beberapa ternak (AISEN *et al.*, 2000; YILDIZ *et al.*, 2000). Salah satu cara untuk memprediksi kesuburan pejantan adalah dengan melihat daya tahan simpan (*longevity*) semen segar, berdasarkan motilitas. Pada penyimpanan suhu ruang, semen segar dianggap baik apabila motilitas setelah 3 dan 8 jam minimal adalah 45 dan 10% (MOREL, 1999).

Pada penelitian ini dipelajari daya tahan simpan semen segar pada suhu ruang dan lemari es. Penyimpanan semen segar pada suhu lemari es bermanfaat bila IB memerlukan transportasi dan untuk menghindari kerusakan spermatozoa oleh perubahan suhu dan efek sinar matahari. Berkaitan dengan dosis IB juga ingin diketahui kualitas semen cair pada konsentrasi spermatozoa berbeda dalam pengencer Dimitropoulos (IJAZ dan DUCHARME, 1995) yang disuplementasi dengan fruktosa 50 mM.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan

Penelitian dilaksanakan di Athena Stable Sawangan-Depok dan Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Semen dikoleksi dari 3 ekor kuda jantan (1 ekor G4 Thoroughbred, 1 ekor American Pinto, dan 1 ekor Swedish Warmblood), berumur 4-8 tahun, dengan bobot hidup 500-650 kg dan sehat secara klinik. Selama penelitian semua kuda menjalani aktivitas rutin dan diberi pakan berupa konsentrat masing-masing 10 kg $e^{-1}h^{-1}$, serta rumput yang dilayukan 10 kg $e^{-1}h^{-1}$. Kuda juga diberi pakan tambahan berupa madu dan kuning telur setiap selesai penampungan. Sedangkan air diberikan secara *ad libitum*. Seekor kuda betina yang sedang estrus atau mendapat perlakuan induksi estrus (dengan hormon) dipergunakan sebagai pemancing.

Koleksi dan karakterisasi semen segar

Semen dikoleksi 2 kali per minggu dengan menggunakan vagina buatan tipe Nishikawa yang dikombinasikan dengan tabung penampung tipe Missouri. Pemisahan fraksi gel dilakukan dengan memasang kain kasa beberapa lapis pada mulut tabung koleksi. Semen segar selanjutnya dievaluasi secara makroskopik yang meliputi volume tanpa fraksi gel, pH, konsistensi, warna dan osmolaritas, dan secara

mikroskopik yang meliputi motilitas (M%), persentase hidup (H%), konsentrasi dan abnormalitas (Abn%).

Evaluasi makroskopik

Volume dan warna semen diketahui langsung karena tabung penampung berskala dan transparan. Konsistensi semen diketahui dengan memiringkan semen di dalam tabung dan mengembalikan ke posisi semula sehingga diketahui kecepatan cairan kembali ke posisi semula. Derajat keasaman (*pH*) semen diukur dengan kertas indikator *pH* (skala 6,4-8,0). Osmolaritas semen diukur dengan menggunakan osmometer.

Evaluasi mikroskopik

Persentase spermatozoa motil progresif (motilitas = M%) dinilai berdasarkan persentase spermatozoa yang bergerak lurus ke depan. Sampel semen diencerkan dengan NaCl 0,9% (perbandingan 1 : 3) pada permukaan gelas objek, ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 10 x 40. Persentase spermatozoa hidup (H%) dan Abnormalitas (Abn%) dievaluasi dengan pewarna eosin-nigrosin 2%. Sampel semen dan zat pewarna dicampur (1 : 3) pada gelas objek, dibuat preparat ulas tipis, difiksasi dengan panas bunsen, dan diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 10 x 40. Spermatozoa hidup ditandai bagian kepala berwarna terang, sedangkan yang mati berwarna merah-ungu. Abnormalitas spermatozoa dinilai berdasarkan abnormalitas primer dan sekunder (BARTH dan OKO, 1986). Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer, dengan mengencerkan sampel sebanyak 100 kali menggunakan NaCl 3%. Penghitungan dilakukan pada 5 kotak besar yang terletak diagonal sehingga konsentrasi spermatozoa yang diperoleh adalah: $Y \times 5 \times 10^6$ sel/mL (Y = spermatozoa pada ke-5 kotak).

Daya tahan semen segar

Sampel semen segar yang sudah dievaluasi secara makroskopik dan mikroskopik disimpan di dalam tabung-tabung kecil bertutup (sistem pool) pada suhu ruang (24-29°C) dan lemari es (3-5°C). Evaluasi terhadap M% dan H% dilakukan setiap 3 jam sampai motilitasnya mendekati 0%.

Pengenceran dan kualitas semen cair

Semen segar dievaluasi dan disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 20 menit. Plasma dibuang dan pelet dilarutkan dengan pengencer Dimitropoulos (DV) yang disuplementasi dengan fruktosa 50 mM sampai konsentrasi spermatozoa 200, 100 dan 50 x 10⁶

sel/mL (masing-masing sebagai perlakuan K1, K2 dan K3). Media DV (setiap 100 mL) mengandung glukosa 2,00 g, fruktosa 2,00 g, glisin 0,94 g, Na sitrat 2,00 g, kuning telur 20 mL, penisilin 50000 IU, streptomisin 50 mg dan aquades *ad* 100 mL. Pengencer DV yang disuplementasi fruktosa 50 mM mempunyai pH 6,70 dan osmolaritas 394 mOsm/kg. Selanjutnya, semen cair disimpan pada suhu ruang dan lemari es. Evaluasi M% dan H% semen cair yang disimpan pada suhu ruang dilakukan setiap 3 jam sedangkan semen cair yang disimpan pada lemari es diamati setiap 12 jam. Penghitungan total spermatozoa normal motil (TNM), sebagai penentuan dosis IB mengikuti persamaan: $TNM = M \% \times \text{normal} \% \times \text{konsentrasi}$ (COLENBRANDER *et al.*, 1992).

Rancangan percobaan dan analisis data

Seluruh perlakuan pada penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap. Semua data disajikan dalam rata-rata \pm standar deviasi. Data dianalisis dengan sidik ragam searah (Anova) menggunakan program SAS dan jika ada perbedaan antar-perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan. Uji daya tahan semen segar dilakukan dalam 9 kali ulangan, sedangkan kualitas semen cair dilakukan dalam 12 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

Karakteristik semen segar yang diperoleh dari ketiga pejantan dirangkum pada Tabel 1. Berdasarkan beberapa karakteristik yang dievaluasi, baik secara makroskopik maupun mikroskopik semen segar menunjukkan kualitas yang cukup baik. Secara makroskopik, semen segar mempunyai volume tanpa gel $29,3 \pm 9,3$ mL, pH $7,0 \pm 0,1$, konsistensi encer, berwarna putih-susu, dan osmolaritas $301,7 \pm 10,5$ mOsm/kg. Sementara itu, secara mikroskopik, mempunyai motilitas $67,1 \pm 9,1\%$, persentase hidup $77,9 \pm 6,5\%$, konsentrasi $211,9 \pm 21,2 \times 10^6$ /mL, spermatozoa total $6,3 \pm 2,5 \times 10^9$ /ejakulat, dan abnormalitas $27,3 \pm 4,6\%$.

Karakteristik semen segar, baik secara makroskopik maupun mikroskopik tidak berbeda dengan yang didapatkan oleh MOREL (1999), yaitu volume (tanpa fraksi gel) sebesar 28,3 mL, 30,2 mL dan 23,8 mL untuk kuda *Thoroughbred*, *Standarbred* dan *Quarterhorse*; secara berurutan. Tingkat keasaman pH 6,20–7,80; berwarna putih-susu; osmolaritas 290-310 mOsm/kg; H% di atas 60%. Sementara itu, konsentrasi dan spermatozoa total adalah $114,29 \times 10^6$ /mL dan $5,03 \times 10^9$ /ejakulat, $97,24 \times 10^6$ /mL dan $4,74 \times 10^9$ /ejakulat, serta $171,66 \times 10^6$ /mL dan $5,37 \times 10^9$ /ejakulat untuk

Tabel 1. Karakteristik sifat fisik semen segar

Karakteristik	Rataan	Kisaran
Volume tanpa gel (mL)	29,3 ± 9,3	15,0-55,0
pH	7,0 ± 0,1	6,7-7,2
Konsistensi	Encer	-
Warna	putih keruh	-
Osmolaritas (mOsm/kg)	301,7 ± 10,5	291-312
Motilitas (%)	67,1 ± 9,1	35-75
Hidup (%)	77,9 ± 6,5	52,2-82,7
Konsentrasi (10 ⁶ /mL)	211,9 ± 21,2	180-265
Spermatozoa total (10 ⁹ /ejakulat)	6,3 ± 2,5	2,9-12,9
Abnormalitas (%)	27,3 ± 4,6	19,2-37,5

kuda *Thoroughbred*, *Standardbred* dan *Quarterhorse* secara berurutan. TOELIHERE (1993) mendapatkan semen segar dengan volume 70 mL (berkisar 30–250 mL), pH 7,0-7,8, berwarna terang sampai kelabu, dan konsistensi encer. Sementara itu, GARNER dan HAFEZ (2000) mendapatkan motilitas sebesar 40-75% dan morfologi normal 60-90%.

Variasi perolehan nilai volume semen sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti: umur, kapasitas kerja, musim, bangsa, frekuensi ejakulasi, latihan koleksi (*teasing*) dan kesehatan (MOREL, 1999). Disisi lain, konsistensi semen sangat tergantung pada fraksi yang ditampung seperti fraksi pra-spermatozoa encer (*watery*), fraksi kaya-spermatozoa kental seperti susu (*milky, nonviscous*), dan fraksi pasca-spermatozoa sangat kental (*highly viscous*) (GARNER dan HAFEZ, 2000). Warna dan konsistensi semen dipengaruhi oleh urospermia, hemospermia, pyospermia, dan konsentrasi spermatozoa (MOREL, 1999). Sedangkan peningkatan pH mungkin dijumpai pada semen setelah ejakulasi kedua, konsentrasi plasma yang rendah, dan infeksi pada saluran reproduksi (MALMGREN, 1992). Volume, konsentrasi, dan spermatozoa total menjadi indikator kapasitas reproduksi pejantan yang bergantung pada proses spermatogenesis. Proses ini dipengaruhi oleh musim, massa testis, umur, frekuensi penampungan, bangsa, kelainan jaringan testis, lingkungan, latihan koleksi, hormonal dan kelainan fisik (MOREL, 1999).

Daya tahan simpan semen segar

Daya tahan simpan semen segar berdasarkan M% dan H%, tertera pada Tabel 2. Motilitas setelah 3 dan 9 jam penyimpanan pada suhu ruang berturut-turut adalah 48,33 ± 10,52% dan 20,00 ± 7,98%, sedangkan pada

lemari es adalah 41,67 ± 8,88% dan 12,92 ± 7,22%. Sementara itu, H% dalam waktu simpan yang sama adalah 71,49 ± 6,32% dan 50,40 ± 7,37% pada suhu ruang dan 65,82 ± 6,68% dan 41,07 ± 8,34% pada lemari es. Perbedaan M% dan H% yang nyata ($P < 0,05$) antara penyimpanan pada suhu ruang dan lemari es dapat terlihat setelah 3 jam (Tabel 2). Semen yang disimpan pada suhu lemari es memperlihatkan penurunan M% dan H% lebih cepat daripada semen yang disimpan pada suhu ruang, sehingga pada setiap titik pengamatan semen yang disimpan pada suhu ruang menunjukkan M% dan H% nyata lebih tinggi.

Disamping karakteristik fisik yang baik, semen yang akan digunakan untuk program IB harus mempunyai daya tahan simpan baik. Daya tahan spermatozoa berdasarkan M% sering dikaitkan dengan dugaan fertilitas pejantan. MOREL (1999) memberikan batasan agar layak digunakan pada program IB, maka daya tahan simpan semen segar (M%) pada suhu ruang setelah 3 jam sebaiknya di atas 45%, dan setelah 8 jam di atas 10%. Dengan demikian, karena M% setelah 3 jam dan 9 jam penyimpanan pada suhu ruang adalah 48,33 ± 10,52% dan 20,00 ± 7,98%, maka semen pada penelitian ini mempunyai daya tahan yang cukup baik.

Penyimpanan semen pada suhu di bawah 20°C dapat menekan metabolisme sehingga memperpanjang motilitas, namun demikian dapat menyebabkan spermatozoa rentan terhadap efek *cold shock* sehingga banyak sel yang rusak dan mati (KAYSER *et al.*, 1992). Efek *cold shock* ini berkaitan dengan perubahan fosfolipid pada membran, yaitu perubahan bentuk dari cair ke gel yang terjadi pada suhu di bawah 20°C. Perubahan tatanan rantai asam lemak dan protein secara acak, pada tempat tertentu menyebabkan kebocoran atau selektivitas membran rusak, sehingga ion-ion

Tabel 2. Persentase motilitas (M%) dan hidup (H%) semen segar pada suhu ruang dan lemari es

Penyimpanan (jam)	Motilitas (M%)		Hidup (H%)	
	suhu ruang	suhu lemari es	suhu ruang	suhu lemari es
0	71,67 ± 3,89	71,67 ± 3,89	79,70 ± 3,65	79,70 ± 3,65
3	48,33 ± 10,52 ^a	41,67 ± 8,88 ^b	71,49 ± 6,32 ^a	65,82 ± 6,68 ^b
6	32,92 ± 10,33 ^a	22,50 ± 9,42 ^b	62,34 ± 7,85 ^a	55,52 ± 5,55 ^b
9	20,00 ± 7,98 ^a	12,92 ± 7,22 ^b	50,40 ± 7,37 ^a	41,07 ± 8,34 ^b
12	10,42 ± 5,82 ^a	5,00 ± 4,47 ^b	36,12 ± 7,57 ^a	28,61 ± 5,12 ^b
15	3,75 ± 3,11 ^a	1,25 ± 2,26 ^b	26,51 ± 4,31 ^a	20,95 ± 2,99 ^b

Superskrip berbeda pada baris yang sama pada masing-masing M dan H berbeda nyata ($P < 0,05$)

tertentu misalnya Ca bebas masuk (WHITE, 1993). Sementara itu, penyimpanan pada suhu ruang menyebabkan spermatozoa cepat kehabisan sumber energi, penurunan pH media oleh penimbunan asam laktat sebagai sisa metabolisme, perubahan akibat penuaan dan pertumbuhan kuman (TOELIHERE, 1993). Untuk itu penyimpanan pada suhu mendekati 0°C memerlukan tambahan zat pelindung dalam media simpan, misalnya fosfolipid kuning telur atau krioprotektan, dan proses pendinginan perlu dilakukan secara perlahan (KAYSER *et al.*, 1992).

Daya tahan simpan semen cair

Hasil pengamatan untuk daya tahan semen cair pada suhu ruang dirangkum pada Tabel 3, sedangkan untuk suhu lemari es pada Tabel 4. Pada penyimpanan suhu ruang, perlakuan 3 ($K3 = 50 \times 10^6$ sel/mL) menunjukkan nilai M% nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) (Tabel 3) dibandingkan dengan perlakuan 1 ($K1 = 200 \times 10^6$ sel/mL) setelah 18 jam penyimpanan, masing-masing sebesar $20,83 \pm 9,49\%$ dan $12,92 \pm 6,32\%$. Sementara itu, berdasarkan nilai H%, K3 menunjukkan nilai M% nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan K1 setelah 9 jam penyimpanan, masing-masing sebesar $63,51 \pm 2,79\%$ dan $60,51 \pm 2,86\%$.

Pada penyimpanan suhu lemari es, K3 menunjukkan nilai M% nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) (Tabel 4) dibandingkan dengan K1 setelah 60 jam penyimpanan, masing-masing sebesar $37,50 \pm 6,57\%$ dan $30,00 \pm 8,26\%$. Sementara itu, berdasarkan nilai H%, K3 menunjukkan nilai nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan nilai H% perlakuan K1 setelah 48 jam penyimpanan, ($61,30 \pm 4,09\%$ dan $57,66 \pm 3,35\%$). Namun demikian berdasarkan nilai M%, perlakuan 2 ($K2 = 100 \times 10^6$ sel/mL) tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan perlakuan lain, baik pada penyimpanan suhu ruang maupun lemari es. Sementara itu,

berdasarkan nilai H%, K2 menunjukkan perbedaan nyata dengan perlakuan lain setelah 18 jam (suhu ruang) dan 72 jam (suhu lemari es).

Penyimpanan semen cair pada konsentrasi spermatozoa lebih rendah mempunyai kualitas yang relatif lebih baik dengan daya simpan lebih lama dibandingkan dengan konsentrasi lebih tinggi. Hal ini mungkin berkaitan dengan keterbatasan sumber energi, pH dan osmolaritas media (POMMER *et al.*, 2000; WENDT *et al.*, 2002), jumlah plasma terikut (JASKO *et al.*, 1992; LOVE *et al.*, 2002), serta jumlah spermatozoa yang mati (VISWANATH dan SHANNAN, 2000; BRINSKO *et al.*, 2003). Pada penelitian ini semua perlakuan mengandung sumber energi yang sama. Dengan demikian, maka semen cair dengan konsentrasi spermatozoa lebih tinggi (berarti pengencer dan sumber energi sedikit) akan lebih cepat memetabolisme fruktosa dan terjadi penurunan pH media, sehingga lebih banyak spermatozoa mati.

Pemisahan dan pembuangan atau pengurangan plasma semen pada semen cair antara lain bermanfaat untuk mengurangi efek negatif plasma (kandungan Na tinggi) dan mengurangi mikroba sehingga mengurangi kompetisi nutrisi dan efek patogenik (MOREL, 1999). Media pengencer yang ditoleransi baik oleh spermatozoa mempunyai pH 6,6-7,2 (WENDT *et al.*, 2002) dan osmolaritas 250-450 mOsm/kg (MOREL, 1999; POMMER *et al.*, 2002). Spermatozoa yang mati selama penyimpanan juga akan berefek negatif terhadap spermatozoa yang hidup, karena sel yang mati akan melepaskan *aromatic amino acid oxydase* (AAAO) yang dapat memicu pembentukan hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bersifat toksik (VISWANATH dan SHANNAN, 2000). BRINSKO *et al.* (2003) menyatakan bahwa penambahan spermatozoa mati ke dalam semen cair sebanyak 50% pada konsentrasi akhir 100×10^6 sel/mL menurunkan secara nyata M% dan persentase integritas membran setelah 24 jam.

Tabel 3. Persentase motil progresif (M%) dan hidup (H%) semen cair pada suhu ruang

Penyimpanan (jam)	Perlakuan (juta sel/mL)		
	(K1 = 200)	(K2 = 100)	(K3 = 50)
-----Motilitas (%)-----			
0	67,08 ± 7,53	67,08 ± 7,53	67,08 ± 7,53
3	54,17 ± 7,02	55,42 ± 7,82	55,83 ± 7,02
6	46,25 ± 7,42	48,75 ± 6,44	50,00 ± 7,07
9	38,33 ± 9,13	40,42 ± 7,82	43,33 ± 8,62
12	28,75 ± 8,56	32,92 ± 8,91	35,00 ± 8,79
15	21,67 ± 6,16	25,00 ± 9,29	28,33 ± 8,62
18	12,92 ± 6,32 ^b	16,25 ± 7,69 ^{ab}	20,83 ± 9,49 ^a
21	5,00 ± 6,03 ^b	9,58 ± 7,82 ^{ab}	12,92 ± 7,82 ^a
24	1,25 ± 3,11 ^b	2,92 ± 3,34 ^{ab}	6,25 ± 5,28 ^a
-----Hidup (%)-----			
0	78,53 ± 3,53	78,53 ± 3,53	78,53 ± 3,53
3	72,60 ± 2,70	72,66 ± 2,51	73,20 ± 3,28
6	66,32 ± 3,09	67,16 ± 2,56	68,28 ± 3,15
9	60,51 ± 2,86 ^b	61,90 ± 3,44 ^{ab}	63,51 ± 2,79 ^a
12	54,30 ± 2,72 ^b	56,48 ± 3,22 ^{ab}	58,42 ± 3,19 ^a
15	47,82 ± 3,62 ^b	50,22 ± 3,27 ^{ab}	52,75 ± 2,99 ^a
18	41,02 ± 2,78 ^c	43,53 ± 2,95 ^b	47,64 ± 3,13 ^a
21	33,87 ± 2,89 ^c	36,62 ± 2,14 ^b	41,00 ± 2,53 ^a
24	27,89 ± 2,78 ^c	30,39 ± 1,82 ^b	35,08 ± 5,38 ^a

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

Tabel 4. Persentase motil progresif (M%) dan hidup (H%) semen cair pada lemari es

Penyimpanan (jam)	Perlakuan (juta sel/mL)		
	(K1=200)	(K2=100)	(K3=50)
-----Motilitas (%)-----			
0	67,08 ± 7,53	67,80 ± 7,53	67,08 ± 7,53
12	55,83 ± 5,57	57,50 ± 6,91	57,92 ± 7,22
24	49,17 ± 6,34	50,00 ± 6,39	51,25 ± 6,08
36	43,33 ± 6,85	44,17 ± 7,02	46,67 ± 5,77
48	36,67 ± 8,62	38,75 ± 7,72	41,67 ± 5,77
60	30,00 ± 8,26 ^b	33,75 ± 7,72 ^{ab}	37,50 ± 6,57 ^a
72	22,92 ± 7,22 ^b	25,42 ± 6,56 ^{ab}	30,42 ± 6,20 ^a
84	15,42 ± 6,56 ^b	18,75 ± 7,11 ^{ab}	23,75 ± 7,42 ^a
96	9,17 ± 5,97 ^b	12,08 ± 7,53 ^{ab}	16,25 ± 7,42 ^a
-----Hidup (%)-----			
0	78,53 ± 3,53	78,53 ± 3,53	78,53 ± 3,53
12	72,05 ± 4,42	72,73 ± 5,08	73,69 ± 4,35
24	67,13 ± 4,58	68,63 ± 4,29	69,22 ± 4,22
36	61,93 ± 3,88	63,75 ± 4,10	65,26 ± 3,98
48	57,66 ± 3,35 ^b	59,05 ± 3,44 ^{ab}	61,30 ± 4,09 ^a
60	52,52 ± 2,39 ^b	54,63 ± 2,61 ^b	57,31 ± 3,70 ^a
72	47,48 ± 1,85 ^c	50,02 ± 2,39 ^b	52,74 ± 3,18 ^a
84	41,60 ± 1,75 ^c	44,76 ± 2,18 ^b	48,49 ± 2,96 ^a
96	36,08 ± 2,07 ^c	40,01 ± 2,19 ^b	42,90 ± 3,19 ^a

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

Pengenceran semen cair secara berlebihan dapat berefek negatif terhadap spermatozoa karena beberapa komponen membran bisa terlepas (MOREL, 1999). Pengenceran semen cair sebaiknya dilakukan hingga konsentrasinya $25-75 \times 10^6$ sel/mL, sedangkan untuk semen beku $200-800 \times 10^6$ sel/mL (SQUIRES dan PICKETT, 1996). Pengenceran juga harus memperhatikan dosis IB. Volume semen per dosis IB yang disarankan adalah 10-30 mL untuk semen segar, 30-60 mL untuk semen cair dan 0,5-5,0 mL untuk semen beku (British Equine Veterinary Association 1997 in MOREL, 1999). Untuk IB dengan semen cair dan semen beku, M% minimal yang disarankan adalah 25-30% (SQUIRES dan PICKETT, 1996).

Beberapa peneliti menyarankan IB dengan semen cair sebaiknya mengandung 250×10^6 spermatozoa motil progresif (JASKO *et al.*, 1992). Sementara itu, menurut COLENBRANDER *et al.* (1992), IB menggunakan semen cair sebaiknya mengandung 300×10^6 spermatozoa total normal motil (TNM), atau 600×10^6 TNM bila memerlukan 4-6 jam perjalanan. JASKO *et al.* (1992) melakukan IB menggunakan semen cair dengan jumlah spermatozoa motil 250 juta, dengan volume 10 mL dan 50 mL. Hasilnya, embrio terkoleksi berbeda nyata ($P < 0,05$), masing-masing adalah 70,0% dan 35,3%. Fertilitas yang rendah pada IB dengan volume yang besar kemungkinan disebabkan oleh penurunan konsentrasi secara berlebihan yang menyebabkan kerusakan spermatozoa.

Pada penelitian ini, dengan rata-rata M% semen segar sekitar 67% dan morfologi spermatozoa normal sekitar 73% (Tabel 1), maka pada perlakuan K3, K2 dan K1 masing-masing mengandung sekitar $24,5 \times 10^6$, $48,9 \times 10^6$ dan $97,8 \times 10^6$ TNM/mL. Apabila motilitasnya 25%, maka pada perlakuan K3, K2 dan K1 masing-masing mengandung $9,1 \times 10^6$, $18,3 \times 10^6$ dan $36,5 \times 10^6$ TNM/mL. Dengan demikian, apabila dosis IB yang dipakai sebesar 250×10^6 TNM akan dipenuhi dari sekitar 34 mL pada K3, 17 mL pada K2 dan 8,5 mL pada K1. Berdasarkan perhitungan ini, maka pada penyimpanan suhu ruang semen cair masih layak dipergunakan untuk IB sampai dengan 12 jam pada K1, atau 18 jam pada K2 dan K3. Dengan asumsi dan perhitungan yang sama maka penyimpanan pada suhu $3-5^\circ\text{C}$ memperlihatkan bahwa semen cair masih layak dipergunakan untuk IB sampai sekitar 60 jam pada K1, 72 jam pada K2 dan 84 jam pada K3.

Hasil ini menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu ruang dan lemari es, semen cair dengan konsentrasi 50×10^6 sel/mL (K3), mempunyai kualitas lebih baik dan daya tahan simpan lebih lama daripada konsentrasi 100×10^6 sel/mL dan 200×10^6 sel/mL. Namun demikian, perlu penelitian untuk mengetahui apakah kondisi yang sama berlaku untuk kuda-kuda lokal Indonesia. Semen cair dengan konsentrasi lebih tinggi (terutama K1) lebih banyak spermatozoa yang mati

selama penyimpanan. Meskipun dengan perhitungan semen masih layak untuk program IB sampai M% mendekati 25%, sebaiknya tidak digunakan karena mungkin akan menurunkan fertilitas.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan karakteristik makroskopik dan mikroskopik, serta uji daya tahan simpan kualitas semen segar pada penelitian ini cukup baik. Uji daya simpan semen segar pada suhu ruang menunjukkan M% sebesar $48,33 \pm 10,52\%$ dan $20,00 \pm 7,98\%$ pada 3 jam dan 9 jam setelah penyimpanan. Penurunan daya tahan (M% dan H%) semen segar yang disimpan pada suhu lemari es lebih cepat daripada suhu ruang. Pada semen cair, kualitas dan daya tahan simpan lebih baik terjadi pada konsentrasi 50×10^6 sel/mL dibandingkan dengan 100×10^6 sel/mL dan 200×10^6 sel/mL. Namun demikian, diperlukan penelitian untuk mengetahui apakah kondisi yang sama berlaku untuk kuda-kuda lokal Indonesia. Untuk memperbaiki kualitas semen cair perlu diteliti pengaruh penurunan suhu secara perlahan dan mikrobiologi semen.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada manajemen Athena Stables, Sawangan Depok yang telah mengizinkan pemakaian hewan. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. drh. Mozes R. Toelihere, MSc (Alm) atas dedikasinya pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- AISEN E.G., H.L. ALVAREZ, A. VENTURINO and J.J. GARDE. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- BARTH A.D. and R.J. OKO. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa: Iowa State University Press.
- BRINSKO S.P., T.L. BLANCHARD, S.L. RIGBY, C.C. LOVE and D.D. VARNER. 2003. Effect of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-storage equine semen. *Theriogenology* 59: 735-742.
- COLENBRANDER B., H. PUYK, A.R. ZANDEE and J. PARLEVLEIT. 1992. Evaluation of the stallion for breeding. In: RODRIGUEZ-MARTINEZ H, EINARSSON S (Eds). *Proceeding of the Symposium at the 1st Meeting on the Veterinary Associations of the Nordic Countries, Uppsala Sweden, 1-2 Oct. 1992*. Uppsala: The Veterinary Associations of the Nordic Countries. pp 29-38.

- EILTS, B.E. 2004. Stallion Breeding Soundness Examination. <http://www.vetmed.lsu.edu/eiltslotus/theriogenology-5361/stallion.htm> (3 Mei 2007).
- GARNER, D.L. and E.S.E. HAFEZ. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: ESE HAFEZ and B HAFEZ (Eds). *Reproduction In Farm Animals*. Ed ke-7. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- HERMAWATI, D. 2003. Khasiat Susu Kuda Sumbawa untuk Kesehatan Masyarakat. Makalah pada Semiloka Perkudaan Indonesia. Jakarta, 4 September 2003.
- IJAZ, A. and R. DUCHARME. 1995. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. *Theriogenology* 44: 1039-1050.
- JASKO, D.J., J.M. MARTIN and E.L. SQUIRES. 1992. Effect of insemination volume and concentration of spermatozoa on embryo recovery in mares. *Theriogenology* 36: 233-239.
- KAYSER, J.P., R.P. AMANN, R.K. SHIDEFER, E.L. SQUIRES, D.J. JASKO and B.W. PICKETT. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 38: 601-614.
- LOVE, C.C., J.A. THOMPSON, S.P. BRINSKO, S.L. RIGBY, T.L. BLANCHARD and D.D. VARNER. 2002. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology* 58: 221-224.
- MALMGREN L. 1992. Sperm Morphology in Stallions in Relation to Fertility. In: H RODRIGUEZ-MARTINEZ and S EINARSSON (Eds). Proceeding of the Symposium at the 1st Meeting on the Veterinary Associations of the Nordic Countries, Uppsala Sweden, 1-2 Oct., 1992. Uppsala.
- MOREL, D.M.C.G. 1999. Equine Artificial Insemination. Oxon: CABI Publishing.
- POMMER, A.C., J. RUTTLANT and S.A. MEYERS. 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology* 58: 1373-1384.
- PUTRO, P.P. 2003. *Produksi dan Konsumsi Daging Kuda di Yogyakarta*. Makalah pada Semiloka Perkudaan Indonesia. Jakarta, 4 September 2003.
- SQUIRES, E.L. and B.W. PICKETT. 1996. Pregnancy Rate with Cryopreserved Semen. Proceeding of the Symposium on the Techniques for Handling and Utilization of Transported Cooled and Frozen Equine Spermatozoa, Fort Collin Colorado, 7-8 Nov 1996. Fort Collin Colorado: Equine Science, Colorado State University.
- SUDARDJAT, S. 2003. Sambutan Direktur Jenderal Bina Produksi Peternakan Pada Acara Semiloka Perkudaan Di Indonesia. Jakarta, 4 September 2003.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Angkasa.
- VISHWANATH, R. and P. SHANNAN. 2000. Storage of bovine in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 23-53.
- WENDT, K.M., C.C. LOVE, S.P. BRINSKO, J.A. THOMPSON, T.L. BLANCHARD and D.D. VARNER. 2002. Effect of extender pH on motility characteristics of cool-stored equine spermatozoa. *Theriogenology* 58(2-4): 321-324.
- WHITE, I.G. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.
- YILDIZ, C., A. KAYA, M. AKSOY and T. TEKELI. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.