

Karakteristik Plasma Semen dan Kriopreservasi Semen Anoa (*Bubalus sp.*) yang Dikoleksi Menggunakan Elektroejakulator

YUDI¹, T.L. YUSUF², B. PURWANTARA¹, D. SAJUTHI² dan M. AGIL¹

¹Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

²Bagian Penyakit Dalam, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680.

(Diterima Dewan Redaksi 3 Januari 2011)

ABSTRACT

YUDI, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA, D. SAJUTHI and M. AGIL. 2011. Characteristics of seminal plasma and cryopreservation of anoa (*Bubalus sp.*) semen obtained by electroejaculation. *JITV* 16(1): 41-48.

The population of anoa, which is an endemic fauna to Indonesia, was getting decrease caused by the illegal hunting and deforestation. Anoa is included in endangered species by IUCN, and Appendix I by CITES. The experiment aimed to characterize the seminal plasma contents and to cryopreserve the anoa semen for artificial insemination application in captivity. The experiment was carried out in Taman Safari Indonesia (Bogor). Semen was collected from 2 anesthetized males (4-10 years) by electroejaculation. Seminal plasma gained by centrifugation of ejaculate (3000 rpm, 20 minutes), and then was evaluated the biochemical contents. Other ejaculates were evaluated macroscopically and microscopically, and then extended in Tris and Na-citrate media to a total concentration of 100 billion cells mL⁻¹. Extended semen was stored at 4°C, and evaluated the motility and viability every 12 h. Frozen semen was made in Tris medium added with 5% of glycerol. The seminal plasma of anoa contained total lipid, Na, Ca and Mg higher than the buffalo, but its total protein, K and Cl were lower. Electrophoresis of seminal plasma using by SDS-PAGE method showed 10 bands of proteins (17-148 kDa). The motility and viability of chilled-extended semen in Tris and Na-citrate media were not significantly different ($P > 0.05$) during 72 h of evaluation. Extended semen in both of media may applicable for AI program for 24-48 h. Post thawing motility of frozen semen was still low, $26.00 \pm 9.62\%$. Therefore, it is necessary to improve each stages of semen processing, so the motility will increased and resulted high pregnancy in AI program.

Key Words: Anoa, Seminal Plasma, Extended Semen, Frozen Semen, Electroejaculator

ABSTRAK

YUDI, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA, D. SAJUTHI dan M. AGIL. 2011. Karakteristik plasma semen dan keberhasilan kriopreservasi semen anoa (*Bubalus sp.*) yang dikoleksi menggunakan elektroejakulator. *JITV* 16(1): 41-48.

Populasi anoa yang merupakan satwa endemik Indonesia semakin menurun oleh karena perburuan liar dan pengalihan fungsi hutan, serta pengembangbiakannya di penangkaran belum berhasil. Oleh karena itu, IUCN memasukkan anoa ke dalam *endangered species*, sedangkan CITES memasukkannya ke dalam *Appendix I*. Penelitian ini bertujuan mengkaji karakteristik plasma semen dan kriopreservasi semen dalam rangka penerapan teknik IB untuk pengembangbiakan anoa. Semen dikoleksi dari 2 anoa jantan (4-10 tahun) di Taman Safari Indonesia (Bogor) menggunakan elektroejakulator. Ejakulat disentrifus (3000 rpm, 20 menit), dan plasma semen dievaluasi kandungan biokimianya. Sampel ejakulat yang lain dievaluasi secara makroskopik dan mikroskopik, lalu diencerkan dengan media Tris dan Na-sitrat dengan konsentrasi 100 juta sel/ml. Semen cair disimpan pada suhu 4°C dan diamati motilitas dan viabilitasnya setiap 12 jam. Pembekuan semen dilakukan dalam media Tris ditambah gliserol 5%. Selama proses pembekuan, semen dievaluasi motilitas dan viabilitasnya setelah diencerkan, diekuilibrasi, dan *thawing*. Plasma semen anoa mengandung lipid total, Na, Ca, dan Mg lebih tinggi, tetapi protein total, K dan Cl lebih rendah dibandingkan dengan semen kerbau. Elektroforesis plasma semen menggunakan SDS-PAGE memperlihatkan 10 pita protein, berkisar 17-148 kDa. Media Tris dan Na-sitrat tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dalam mempertahankan kualitas semen cair, namun Tris sedikit lebih baik. Semen cair dari kedua media masih layak untuk program IB sampai 24-48 jam pada penyimpanan 4°C. Motilitas *posthawing* semen beku masih cukup rendah, yaitu $26,00 \pm 9,62\%$. Oleh karena itu, diperlukan kajian lebih mendalam terkait teknik dan media pengolahan untuk mendapatkan semen dengan motilitas tinggi, dan berhasil baik dalam program IB.

Kata Kunci: Anoa, Plasma Semen, Semen Cair, Semen Beku, Elektroejakulator

PENDAHULUAN

Anoa merupakan hewan langka dan salah satu satwa endemik Indonesia yang habitat aslinya hanya ditemukan di Pulau Sulawesi. Terdapat dua spesies anoa, yaitu anoa dataran rendah (*Bubalus depressicornis*) dan anoa dataran tinggi (*B. quarlesi*) (BURTON *et al.*, 2005). CITES memasukkan anoa ke dalam Appendix I (CITES, 2007), sedangkan IUCN memasukkannya ke dalam *endangered species* (IUCN, 2007). Penyebab utama berkurangnya populasi anoa diduga karena perburuan liar dan pengalihan fungsi hutan menjadi areal pertanian dan pemukiman, sehingga terjadi fragmentasi hutan dan terdesaknya habitat anoa (BURTON *et al.*, 2005). Hingga saat ini, pengembangbiakan anoa di penangkaran juga masih belum berhasil, diduga karena sifat soliter, liar, dan monogami. Padahal, anoa bisa diharapkan sebagai ternak budidaya karena ukuran tubuh dan struktur perototannya mirip dengan kerbau (KASIM, 2004).

Karakteristik reproduksi jantan pada anoa belum banyak diketahui. Penelitian yang telah dilakukan pada anoa kebanyakan adalah berkaitan dengan taksonomi, morfologi, perilaku dan ekologi, kekerabatan, dan kajian sebagai hewan budidaya. Penelitian terkait reproduksi mulai dilakukan dalam upaya penyelamatan anoa, antara lain tentang filogeni dan reproduksi, serta karakteristik ejakulat dan organ reproduksi luar jantan (JUDI *et al.*, 2009). Karakterisasi plasma semen anoa, dan upaya kriopreservasinya untuk keberhasilan reproduksi pada masa akan datang penting dilakukan terutama dalam aplikasi teknologi reproduksi, misalnya inseminasi buatan (IB). Keberhasilan kriopreservasi semen dikombinasi dengan aplikasi teknologi IB akan menjadi bagian penting program *genetic resource bank* dalam penyelamatan keragaman genetik spesies langka (HERMES *et al.*, 2009).

Kandungan dan fungsi bahan kimia dalam plasma semen dari banyak spesies telah diketahui, dan dikaitkan dengan kualitas semen. Beberapa protein plasma semen berperan dalam menstabilkan membran, viabilitas spermatozoa, serta proses reaksi kapasitas, reaksi akrosom dan fertilisasi (BARRIOS *et al.*, 2000; STRZEZECK *et al.*, 2002). Kolesterol berperan penting dalam pembentukan impermeabilitas dan kohesivitas struktur membran (WHITE, 1993). Beberapa karbohidrat seperti fruktosa, glukosa, dan sorbitol merupakan sumber energi bagi spermatozoa (TOELIHERE, 1993). Ion-ion organik dan anorganik terutama berperan sebagai *buffer*, menjaga tekanan osmotik, mempertahankan membran, dan motilitas spermatozoa (TOELIHERE, 1993; EGHBALI *et al.*, 2008).

Pengolahan semen berupa penambahan media pengencer bertujuan untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa secara *in vitro*. Lipoprotein yang ditambahkan pada media pembekuan semen diharapkan

dapat melindungi spermatozoa dari efek *cold shock*, sedangkan krioprotektan yang ditambahkan seperti gliserol dan etilen glikol diharapkan melindungi sel dari kerusakan akibat pembekuan (TOELIHERE, 1993). Dibutuhkan media spesifik untuk pengenceran dan pembekuan semen masing-masing spesies, berkaitan dengan kerentanan spermatozoa terhadap efek pendinginan dan pembekuan. Pada semen kerbau Murrah, bahan pengencer Tris dengan penambahan karbohidrat (fruktosa, glukosa dan laktosa) dan kuning telur mampu mempertahankan motilitas dan persentase hidup spermatozoa (SINGH *et al.*, 1994). Sementara itu, pada rusa (*Iberian red deer*), pengencer Tris-fruktosa dan Na Sitrat-fruktosa menghasilkan semen beku dengan motilitas sama baiknya (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2009).

Penelitian ini ingin mengetahui karakteristik beberapa komponen biokimia plasma semen anoa, sehingga diharapkan dapat menjadi pertimbangan dalam penyusunan media pengencer untuk kriopreservasi semen anoa. Selanjutnya, ingin diketahui kualitas semen cair dan beku anoa dengan menggunakan pengencer berbahan dasar Tris dan Na-sitrat. Dengan demikian, diharapkan menjadi langkah penting dalam upaya kriopreservasi semen dan dalam penyelamatan anoa.

MATERI DAN METODE

Hewan percobaan

Penelitian menggunakan 2 ekor anoa jantan, berumur 4 dan 10 tahun. Kedua anoa memperlihatkan keinginan kawin, dan sudah beberapa kali dikoleksi semennya menggunakan elektroejakulator. Hewan dikandangkan dalam kelompok kecil pada siang hari, dan individu pada malam hari. Hewan mendapat pakan standar rutin, dan pakan imbuhan berupa vitamin A 6000 IU, vitamin B kompleks (vitamin B1 100 mg, vitamin B6 200 mg, dan vitamin B12 200 mg), dan vitamin E 200 IU, setiap hari mulai 2 bulan sebelum koleksi semen. Sekitar 12 jam sebelum koleksi, hewan diinjeksi *chorionic gonadotrophin* (Chorulon[®], Intervet) 750 IU/ekor secara intramuskuler.

Pengendalian hewan

Pengendalian anoa dilakukan dengan anestesi general menggunakan kombinasi ketamine HCl (1,5-2,0 mg/kg BB) dan medetomidine HCl (50-100 µg/kg BB), secara intramuskuler. Selama proses anestesi, hewan ditempatkan di dalam kandang individu. Setelah teranestesi, hewan dibaringkan di atas matras. Segera setelah koleksi, hewan diberi antidota atipamezole 250-500 µg/kg BB secara intramuskuler.

Koleksi semen

Koleksi semen dilakukan menggunakan elektroejakulator, dengan stimulator AC 100 Hz dan *rectal probe* berdiameter 1,5 cm dengan 4 elektroda melingkar (Fujihira-FHK, Jepang). Sebelum *probe* dimasukkan ke dalam rektum, preputium dan daerah sekitarnya dibersihkan dengan NaCl fisiologis dan dikeringkan dengan kertas tisu. *Probe* dilumuri gel pelicin, lalu dimasukkan ke dalam rektum menjangkau seluruh ruang *pelvis* untuk merangsang syaraf-syaraf *ischadicus* dan *pelvis* (TOELIHERE, 1993). Voltase elektroejakulator diatur dari rendah ke tinggi (3-12 V), dengan waktu perangsangan 5 detik, ulangan 3 kali pada setiap voltase, serta jeda antar-ulangan 5 detik. Pengulangan dan kenaikan voltase dilakukan sampai hewan mengalami ereksi dan/atau ejakulasi. Ejakulat ditampung menggunakan tabung steril transparan berskala.

Karakterisasi plasma semen

Plasma semen diperoleh dengan mensentrifugasi semen segar dari satu anoa (3000 rpm, 20 menit). Plasma semen dievaluasi kandungan protein total (metode Kjehdal), lipid total (Soxlet), karbohidrat total (Spektrofotometri), dan beberapa mineral yaitu Na, K, Ca, Mg, Cl, Cu, Mn, Se dan Zn (*analytical absorbent spectrophotometry*) yang dilakukan di Laboratorium Pengujian BB Litbang Pascapanen Pertanian (Bogor). Sebagian plasma semen dilakukan karakterisasi protein dengan metode elektroforesis gel akrilamida (SDS-PAGE) dan pewarnaan *commasie blue*. Protein standar yang digunakan dalam proses SDS-PAGE adalah LMW marker (phosphorylase b 97000, albumin 66000, ovalbumin 45000, *carbonic anhydrase* 30000, trypsin inhibitor 20100, dan α -lactalbumin 14400 Da). Pita-pita protein yang terbentuk pada gel diukur dan dibandingkan dengan pita-pita protein marker (dibuat garis regresi) untuk menghitung bobot molekul (BM) masing-masing pita dalam satuan kilodalton (kDa). Elektroforesis dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, Pusat Penelitian Ilmu Hayati dan Bioteknologi LPPM IPB.

Pembuatan semen cair dan semen beku

Ejakulat dievaluasi secara makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH), dan mikroskopis (motilitas, persentase hidup dan konsentrasi spermatozoa). Derajat keasaman diukur dengan kertas indikator pH skala 6,4-8,0 (Merck, Jerman). Motilitas (%M) dinilai berdasarkan persentase spermatozoa yang bergerak progresif ke depan (skala 0-100%) setelah sampel semen diencerkan dengan NaCl fisiologis (1:2) pada gelas objek, ditutup *cover glass*, dan diamati dengan

mikroskop. Persentase hidup (%H) dievaluasi dengan pewarna eosin-nigrosin. Sedikit semen dan pewarna dicampur (1 : 2) dan dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek, dikeringkan di atas api bunsen, dan dievaluasi dengan mikroskop. Spermatozoa hidup ditandai dengan warna kepala transparan, sedangkan yang mati berwarna merah (TOELIHERE, 1993). Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer, dengan mengencerkan sampel 100 kali menggunakan NaCl 3%. Penghitungan spermatozoa dilakukan pada 5 kotak besar yang terletak diagonal, dengan rumus: $K = Y \times 5 \times 10^6$ sel/mL (K = konsentrasi, Y = jumlah spermatozoa pada 5 kotak). Syarat ejakulat yang diproses mempunyai volume > 0,25 ml, %M > 50, %H > 50, dan konsentrasi > 100 juta sel/ml.

Pembuatan semen cair dan semen beku dilakukan sebanyak 5 kali ulangan (individu sebagai ulangan). Bahan pengencer untuk pembuatan semen cair adalah Tris-kuning telur (Tris) dan Na sitrat-kuning telur (Na-sitrat). Pengencer Tris (100 ml) dan Na-sitrat (100 ml) masing-masing terdiri atas buffer Tris 80 ml dan buffer Na sitrat 80 ml, ditambah kuning telur 20 ml. Buffer Tris (100 ml) mengandung tris 3,649 mg, asam sitrat 1,70 mg dan fruktosa 1,25, sedangkan buffer Na sitrat (100 ml) mengandung Na sitrat 2,90 mg dan fruktosa 1,25 mg. Kedua pengencer ditambah penisilin 1000 IU/ml dan streptomisin 1000 μ g/ml. Pengenceran semen dilakukan dengan konsentrasi sekitar 100 juta sel/ml. Semen cair disimpan dan ditranspor dalam *cooler box* berisi es batu ($\pm 4^\circ\text{C}$) dan setelah sampai di lab dipindahkan ke dalam lemari es ($\pm 4^\circ\text{C}$). Semen cair diamati %M dan %H setiap 12 jam, hingga 72 jam penyimpanan.

Pembekuan semen dilakukan menggunakan pengencer Tris ditambah gliserol 5%. Pembekuan dilakukan dalam kemasan *mini-straw* (0,25 ml), dengan lama ekuilibrase 4 jam pada suhu $\pm 4^\circ\text{C}$ (dalam *cooler box* dan lemari es). Selanjutnya, semen cair dalam *straw* dibekukan di atas uap N_2 (berjarak sekitar 2-3 cm) selama 10 menit, lalu dimasukkan ke dalam N_2 cair. Setelah 30 menit *straw* dipindahkan ke dalam kontainer berisi N_2 cair, dan beberapa sampel *straw dithawing*. Selama proses pembekuan semen dievaluasi %M dan %H setelah diencerkan, ekuilibrase dan *thawing*.

Analisis data

Data karakteristik plasma semen dianalisis dan disajikan secara deskriptif. Data pengamatan semen cair berdasarkan waktu simpan dianalisis dengan Uji T, sedangkan data semen beku berdasarkan tahapan pembekuan dianalisis dengan Uji Duncan menggunakan program Minitab versi 14. Data semen cair dan semen beku disajikan dalam rata-rata dan simpangan baku (standar deviasi).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik plasma semen

Beberapa karakteristik plasma semen anoa, serta plasma semen kerbau dan sapi sebagai pembanding disajikan pada Tabel 1. Dari data tersebut tampak bahwa plasma semen anoa mengandung lipid total, Na, Ca, dan Mg lebih tinggi, sedangkan protein total, K, dan Cl lebih rendah dibandingkan dengan plasma semen kerbau. Sementara itu, apabila dibandingkan dengan plasma semen sapi, protein total, Na, Ca dan Mg dari plasma semen anoa lebih tinggi.

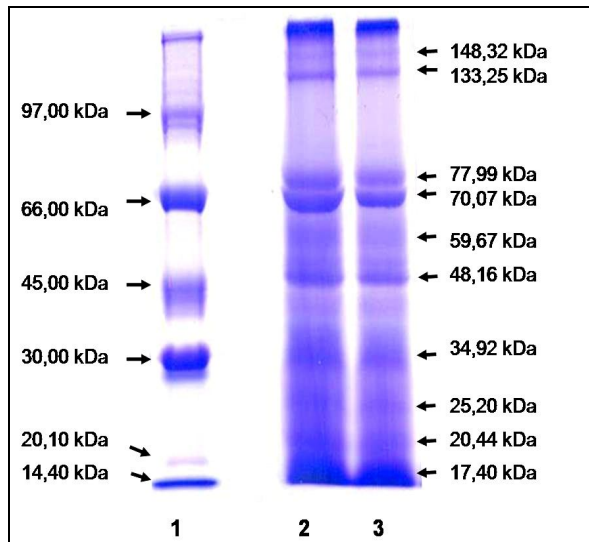
Kandungan kimia plasma semen bervariasi diantara spesies dan bahkan antar-individu, disebabkan antara lain oleh jumlah dan ukuran kelenjar pelengkap, ukuran epididymis dan testis (TOELIHERE, 1993; GARNER dan HAFEZ, 2000), umur, musim, dan level testosteron (THONGTIP *et al.*, 2008). Oleh karena kelenjar pelengkap, epididymis, dan testis sapi secara umum lebih besar daripada kerbau (TOELIHERE, 1993), serta epididymis dan testikuler anoa lebih kecil daripada kerbau (YUDI *et al.*, 2009), maka dapat dimengerti bila karakteristik plasma semen ketiganya berbeda.

Protein plasma semen terutama berperan dalam menjaga viabilitas spermatozoa dan proses fertilisasi (STRZEZECK *et al.*, 2002), serta menstabilkan membran sampai terjadi reaksi kapasitasi dan reaksi akrosom (BARRIOS *et al.*, 2000). Kandungan lipid, terutama asam lemak takjenuh ganda yang tinggi menyebabkan spermatozoa rentan terhadap reaksi peroksidasi, sehingga mempengaruhi ketahanan terhadap *cold shock* (WHITE, 1993). Fruktosa, glukosa, dan sorbitol merupakan sumber energi spermatozoa (TOELIHERE, 1993). Ion-ion organik dalam plasma semen berperan utama sebagai buffer, sedangkan ion-ion anorganik berperan mempertahankan tekanan osmotik, integritas membran, dan motilitas spermatozoa (TOELIHERE, 1993; EGHBALI *et al.*, 2008). Ion Ca dan Mg diduga penting dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa (EGHBALI *et al.*, 2010). Kandungan protein yang relatif lebih rendah dan lipid yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kerbau mungkin mencerminkan daya fertilitas dan daya hidup spermatozoa anoa yang lebih rendah, terlebih dengan kandungan karbohidrat sebagai sumber energi yang rendah, serta Ca dan Mg yang tinggi.

Tabel 1. Karakteristik biokimia plasma semen anoa dan perbandingannya dengan plasma semen kerbau dan sapi

Karakteristik	Anoa	Kerbau ^a	Sapi ^b
Total protein (g/100 ml)	1,75	2,86 ± 0,14	0,68
Total lipid (mg/100 ml)	530	260,86 ± 12,52	--
Total karbohidrat (mg/100 ml)	355	--	--
Fruktosa (mg/100 ml)	--	684,60 ± 81,14	460-600
Sorbitol (mg/100 ml)	--	--	10-140
Asam sitrat (mg/100 ml)	--	466,33 ± 31,66	--
Mineral	(mg/100ml)		
Na	547,55	258,58 ± 13,65	225
K	61,77	154,83 ± 3,27	155
Ca	115,25	32,42 ± 3,10	40
Mg	168,49	6,46 ± 0,39	8
Cl	0,63	224,06 ± 2,60	174-320
Cu	0,14	--	--
Mn	0,21	--	--
Se	0,03	--	--
Zn	0,23	--	--

Sumber: SANSONE *et al.* (2000)^a; GARNER dan HAFEZ (2000)^b
-- tidak dilakukan



Kolom 1 = marker LMW, kolom 2-3 = plasma semen dengan perbedaan volume yang dielektroforesis

Gambar 1. Protein plasma semen yang dipisahkan dengan SDS-PAGE, dengan pewarna *commasie blue*

Hasil karakterisasi protein plasma semen anoa dengan metode SDS-PAGE ditemukan 10 pita protein, dengan bobot molekul berkisar 17-148 kDa (Gambar 1). Beberapa pita protein yang paling jelas mempunyai BM 48,16; 70,07 dan 77,99 kDa. Hasil ini sedikit berbeda dengan plasma semen kerbau yang dilaporkan bahwa 72% pita protein hasil SDS-PAGE mempunyai BM < 35,5 kDa (ASADPOUR *et al.*, 2007).

Kandungan protein plasma semen pada beberapa hewan telah diidentifikasi dan dikaitkan dengan kualitas dan fertilitas spermatozoa. Protein 12-20 kDa dalam plasma semen babi diidentifikasi sebagai *spermadhesin*, protein yang melapisi membran dan mampu berikatan

dengan zona pelusida (STRZEZECK *et al.*, 2002). Pada plasma semen domba, protein < 20 kDa berperan memperbaiki permeabilitas membran spermatozoa (BARRIOS *et al.*, 2000). Pada sapi, protein *bovine seminal plasma* (BSP) 28-30 kDa berperan dalam reaksi kapasitasi dengan menginduksi pelepasan kolesterol sehingga fluiditas membran berkurang (THERIEN *et al.*, 1998). Pada semen manusia, protein 18-95 kDa dikenali sebagai proakrosin/akrosin yang berperan dalam pelisisan zona pelusida (PARDESI *et al.*, 2004), sedangkan protein 54 kDa diidentifikasi sebagai α -L-fucosidase yang berperan dalam penembusan lendir serviks dan transportasi spermatozoa (KHUNSOOK *et al.*, 2002). Pada semen kerbau, fraksi protein 24,5 kDa berkorelasi dengan motilitas ejakulat dan viabilitas semen beku, fraksi 45 kDa berkorelasi dengan abnormalitas semen beku, dan fraksi 55 kDa berkorelasi dengan viabilitas ejakulat (ASADPOUR *et al.*, 2007). Kandungan protein 26 kDa dan 55 kDa yang tinggi dalam plasma semen telah dikaitkan dengan peningkatan jumlah anak sekelahiran pada babi (STRZEZECK *et al.*, 2002).

Kualitas semen cair dan semen beku

Kualitas semen cair dalam pengencer Tris dan Na-sitrat dirangkum pada Tabel 2, sedangkan kualitas semen beku dalam pengencer Tris dan krioprotektan gliserol 5% dirangkum pada Tabel 3. Selama 72 jam penyimpanan pada suhu 4°C, pengencer Tris dan Na-sitrat tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($P > 0,05$) dalam mempertahankan motilitas %M dan %H. Namun, ada kecenderungan pengencer Tris lebih baik dalam mempertahankan kualitas semen cair anoa, sehingga media Tris digunakan dalam pembuatan semen beku.

Tabel 2. Daya tahan semen cair anoa dalam pengencer tris-kuning telur (tris) dan Na sitrat-kuning telur (Na-Sitrat) pada penyimpanan 4°C (rata-rata \pm standar deviasi, n = 5 ulangan)

Parameter/ perlakuan	Lama penyimpanan (jam)						
	0	12	24	36	48	60	72
Motilitas (%)							
Tris	58,00 \pm 5,70	51,00 \pm 4,18	46,00 \pm 6,52	42,00 \pm 5,70	34,00 \pm 7,42	23,00 \pm 8,37	15,00 \pm 6,12
Na-Sitrat	57,00 \pm 4,47	49,00 \pm 2,24	40,00 \pm 7,07	34,00 \pm 7,42	26,00 \pm 5,48	18,00 \pm 5,70	10,00 \pm 5,00
Hidup (%)							
Tris	70,37 \pm 5,59	64,04 \pm 5,47	57,94 \pm 5,06	53,08 \pm 5,89	48,14 \pm 6,92	38,37 \pm 8,84	31,39 \pm 9,98
Na-Sitrat	67,51 \pm 3,58	61,64 \pm 4,09	55,29 \pm 3,75	47,82 \pm 3,39	41,98 \pm 3,77	33,89 \pm 6,70	25,39 \pm 7,48

Superskrip berbeda pada kolom yang sama untuk %M dan %H menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

Tabel 3. Kualitas semen anoa selama proses pembekuan dalam media Tris-kuning telur ditambah gliserol 5% (rata-rata \pm standar deviasi, n = 5 ulangan)

Parameter	Tahapan pengamatan			
	Semen segar	Setelah pengenceran	Setelah ekuilibrasi	Setelah <i>thawing</i>
Motilitas (%)	57,00 \pm 5,70 ^a	52,00 \pm 5,70 ^{ab}	43,00 \pm 9,09 ^b	26,00 \pm 9,62 ^c
Hidup (%)	65,15 \pm 5,49 ^a	59,53 \pm 5,56 ^a	50,33 \pm 6,53 ^b	35,81 \pm 8,94 ^c

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

Hasil pada penelitian ini memperkuat beberapa laporan sebelumnya bahwa media berbahan dasar Tris sesuai digunakan untuk preservasi/kriopreservasi semen bangsa kerbau. SINGH *et al.* (1994) melaporkan bahwa pada kerbau Murrah, media Tris-fruktosa-kuning telur berhasil mempertahankan kualitas semen cair. Begitu juga IJAZ *et al.* (2009) yang melaporkan bahwa media Tris ditambah krioprotektan BHT dapat mempertahankan motilitas dan integritas akrosom semen kerbau Nili-ravi. Pada satwa langka, media Tris-kuning telur cocok untuk kriopreservasi semen rusa (*Iberian red deer*) (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 2009), sedangkan media Tris-sitrat-glukosa direkomendasikan untuk kriopreservasi semen *Spanish Ibex* (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2009).

Kualitas semen beku hasil penelitian ini masih cukup rendah berdasarkan angka %M dan %H pasca *thawing*, yaitu masing-masing sebesar (26,00 \pm 9,62%) dan (35,81 \pm 8,94%). Penurunan %M dan %H terbesar terjadi pada tahapan pasca ekuilibrasi dan pasca *thawing*. Apabila dipersyaratkan motilitas semen cair dan semen beku untuk program IB minimal adalah 30-40%, maka semen cair anoa pada penelitian ini masih layak dipakai pada program IB hingga 36-48 jam (pengencer Tris) atau 24-36 jam (Na-sitrat). Hal ini menyarankan bahwa baik pengenceran menggunakan bahan dasar tris maupun Na-sitrat belum cukup baik dalam pembuatan semen cair anoa. Pada beberapa hewan ternak, semen cair masih bisa diinseminasikan dalam program IB sampai 3-4 hari pada penyimpanan suhu 4°C, sedangkan semen beku menghasilkan motilitas pascathawing sekitar 40% (TOELIHERE, 1993).

Hasil pengolahan semen cair dan semen beku yang belum maksimal pada penelitian ini mungkin disebabkan oleh pilihan jenis dan komposisi bahan pengencer dan krioprotektan belum tepat, suhu dalam bok pendingin selama transportasi tidak stabil, atau karena tingkat kerentanan spermatozoa anoa terhadap efek *cold shock* dan *cryo damage*. Kesesuaian media pengencer dan krioprotektan dalam pengolahan semen sangat ditentukan oleh kerentanan spermatozoa setiap spesies terhadap efek *cold shock* dan *cryo damage* (TOELIHERE, 1993). Hal ini antara lain berkaitan dengan kandungan kolesterol dan asam lemak pada fosfolipid membran spermatozoa (WHITE, 1993). Perbandingan

asam lemak takjenuh dan asam lemak jenuh pada fosfolipid menentukan kerentanan spermatozoa terhadap efek *cold shock*. Pada pengolahan semen, penambahan fraksi lipoprotein densitas rendah (LDF) kuning telur akan mencegah lepasnya fosfolipid membran sehingga meningkatkan toleransi spermatozoa terhadap *cold shock* (BERGERON *et al.*, 2004). Peranan LDF kuning telur dalam preservasi/kriopreservasi diyakini melalui dua cara, yaitu LDF membentuk kompleks dengan protein BSP sehingga BSP tidak menempel ke membran, dan lipid dari LDF atau LDF seluruhnya berikatan dengan membran dan melindunginya. Kompleks LDF dan protein BSP yang terbentuk stabil hingga setelah pembekuan dan *thawing* (MAJUNATH *et al.*, 2002; BERGERON *et al.*, 2004).

Kualitas semen cair dan semen beku pada beberapa satwa langka banyak dilaporkan tidak sebaik pada hewan ternak (TOELIHERE, 1993; DONOGHUE *et al.*, 1993; HERMES *et al.*, 2009). Namun, dalam aplikasi IB telah banyak yang berhasil sehingga penting dilakukan pada program penyelamatan satwa langka. Pada harimau Siberia, DONOGHUE *et al.* (1993) melaporkan IB intrauteri menggunakan 16,8 juta spermatozoa motil menghasilkan kebuntingan dan kelahiran anak. Pada badak, inseminasi dalam keadaan hewan disedasi dengan dosis 500 juta spermatozoa juga berhasil bunting dan melahirkan anak (HERMES *et al.*, 2009). Hal ini karena dosis perkawinan untuk sampai terjadi fertilisasi dengan teknologi IB sebenarnya tidak sebanyak pada perkawinan alam, karena sebagian hambatan yang dilalui spermatozoa telah dikurangi. Oleh karena itu, walaupun kualitas semen cair dan semen beku anoa pada penelitian ini tidak sebaik pada hewan ternak, diharapkan akan dapat menghasilkan kebuntingan dan kelahiran dalam aplikasi teknologi IB sehingga bisa membantu upaya penyelamatan anoa.

KESIMPULAN

Hasil-hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa karakteristik biokimia plasma semen anoa adalah khas, dengan kandungan lipid total, Na, Ca dan Mg lebih tinggi dari semen kerbau, sedangkan protein total, K dan Cl lebih rendah. Baik pengencer Tris maupun Na-

sitrat tidak berbeda nyata dalam mempertahankan motilitas dan persentase hidup semen cair anoa pada penyimpanan 4°C. Berdasarkan motilitas, semen beku dalam pengencer Tris dan gliserol 5% masih perlu perbaikan. Kualitas semen cair dan semen beku layak diaplikasikan dalam program IB pada perkembangbiakan anoa di penangkaran. Namun demikian, perlu kajian lebih mendalam terkait teknik dan media preservasi/kriopreservasi, serta jenis krioprotektan untuk menghasilkan semen berkualitas tinggi, sehingga aplikasi teknik IB bisa berhasil.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ditjen Dikti Kemdiknas Jakarta yang telah membiayai penelitian melalui Program Kompetisi Hibah Bersaing XVI. Terima kasih juga kepada manajemen PT Taman Safari Indonesia Cisarua (Bogor, Jawa Barat) beserta tim medis rumah sakit satwa, dan *keeper* anoa atas segala bantuan yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- ASADPOUR, R., S.M. ALAVI-SHOUSHTARI, S. ASRI REZAI and M.H.Kh. ANSARI. 2007. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 102: 308-313.
- AWADALLAH, S.M., N.M. SALEM, S.A. SALEH, M.S. MUBAROK and A.Z. ELKARMI. 2003. Zinc, magnesium and gamma-glutamyltransferase levels in human seminal fluid. *Bahrain Medic. Bull.* 25: 1-8.
- BARRIOS, B., R. PEREZ-PE, M. GALLEGO, A. TATO, J. OSODA, T. MUINO-BLANCOS and J.A. CEBRIAN-PEREZ. 2000. Seminal plasma protein revert the cold shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63: 1531-537.
- BERGERON, A., M. CRETE, Y. BRINDLE and P. MANJUNATH. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hens egg yolk decreases the binding of major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from sperm membrane. *Biol. Reprod.* 70: 708-717.
- BURTON, J., A.H. MUSTARI dan A.A. McDONALD. 2005. Status dan rekomendasi: Konservasi *in situ* Anoa (*Bubalus sp.*) dan implikasinya terhadap konservasi *ex situ*. *Bul. Konservasi Alam* 5: 35-39.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). 2003. Appendix I. Jenewa, Swiss.
- DONOGHUE, A.M., L.A. JOHNSTON, D.L. ARMSTRONG, L.G. SIMMONS and D.E. WILDT. 1993. Birth of a Siberian tiger cud (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. *J. Zoo Wildlife Med.* 24: 185-189.
- EGHBALI, M., S.M. ALAVI-SHOUSHTARI and S. ASRI-REZAI. 2008. Effects of copper and superoxyde dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pak. J. Biol. Sci.* 11: 1964-1968.
- EGHBALI, M., S.M. ALAVI-SHOUSHTARI, S. ASRI-REZAI and M. H. K. ANSARI. 2010. Calcium, magnesium and total antioxidant capacity (TAC) in seminal plasma of water buffalo (*Bubalus Bubalis*) bulls and their relationships with semen characteristics. *Vet. Res. Forum.* 1: 12-20.
- GARNER, D.L. and E.S.E. HAFEZ. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *In: Reproduction in Farm Animals.* 7th Ed. HAFEZ B. and E.S.E. HAFEZ (Eds). Lippincott Williams & Wilkins, South Carolina. pp. 96-109.
- HERMES, R., F. GORITZ, J. SARAGUSTY, E. SOS, V. MOLNAR, C.E. REID, F. SCHWARZENBERGER and T.B. HILDEBRANDT. 2009. First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros. *Theriogenology* 71: 393-399.
- IJAZ, A., A. HUSSAIN, M. ALEEM, M.S. YOUSAF and H. REHMAN. 2009. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 71: 1326-1329.
- IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE and NATURAL RESOURCES). 2007. The IUCN Red List of Threatened Species: 2001 Categories & Criteria (version 3.1). <http://www.iucnredlist.org/>. [8 Oktober 2007].
- YUDI, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA, D. SAJUTHI dan J. MANANGSANG. 2009. Biometri organ reproduksi bagian luar dan karakteristik ejakulat anoa (*Bubalus sp.*) yang dikoleksi menggunakan elektroejakulator. *Media Petern.* 32: 1-11.
- KANWALL, M.R., N.U. REHMAN, M. AHMAD, H.A. SAMAD, ZIA-UR-RACHMAN, N. AKHTAR and S. ALI. 2000. Bulk cations and trace elements in the Nili-ravi buffalo and crossbred cow bull semen. *Inter. J. Agric. Biol.* 2: 302-205.
- KASIM, K. 2002. Potensi Anoa (*Bubalus depressicornis*) dan (*Bubalus quarlesi*) sebagai Alternatif Satwa Budidaya dalam Mengatasi Kepunahannya. *Disertasi*. Program Pascasarjana, Institut Peranian Bogor, Bogor.
- KHUNSOOK, S., J.A. ALHADEF and B.S. BEAN. 2002. Purification and characterization of human seminal plasma α -L-fucosidase. *Mol. Hum. Reprod.* 8: 221-227.
- MAJUNATH, P., V. NAUCH, A. BERGERON and M. MENARD. 2002. Major protein of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hens egg yolk. *Biol. Reprod.* 67: 1250-1258.
- MARTINEZ-PASTOR, F., F. MARTINEZ, M. ALVAREZ, A. MAROTO-MORALES, O. GARCIA-ALVAREZ, A.J. SOLER, J.J. GARDE, P. DE PAZ and L. ANEL. 2009. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. *Theriogenology* 71: 628-638.

- PARDESI, S.R., S.P. DANDEKER, S.N. JAMDAR and P. HARIKUMAR. 2004. Identification and purification of an aspartic proteinase from human semen. *Ind. J. Clin. Biochem.* 19: 84-92.
- SANSONE G., M.J.F. NASTRI and A. FABROCHINI. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 55-76.
- SANTIAGO-MORENO J., M. A. COLOMA, J. DORADO, A. PULIDO-PASTOR, F. GOMEZ-GUILLAMON, R. SALAS-VEGA, A. GOMEZ-BRUNET and A. LOPEZ-SEBASTIAN. 2009. Cryopreservation of Spanish Ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology* 71: 1253-1260.
- SINGH, T.I., B.N. MOHANTY, D.N. MOHANTY and S.K.H. RAY. 1994. Effects of extenders on the freezability of buffalo semen. *Ind. Vet. J.* 71: 508-509.
- STRZEZECK, J., F. SAIZCIDNHA, P. WYSOCKI, A. TYSZKIEWIEZS and M. JASTRZEBSKI. 2002. Seminal plasma protein as marker of biological value of boar semen. *Anim. Sci. Paper Reports* 20: 255-266.
- THERIEN I., R. MOREAU and P. MANJUNATH. 1998. Major protein of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induced cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol. Reprod.* 59: 768-776.
- THONGTIP N, J. SAIKHUN, S. MAHASAWANGKUL, K. KORNKAEWWRAT, P. PONGSOPAVIJITR, N. SONGSASEN and A. PINYOPUMMIN. 2008. Potential factors affecting semen quality in the Asian elephant (*Elephas maximus*). *Reprod. Biol. Endocrin.* 17: 6-9.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. CV Angkasa. Bandung.
- WHITE, I.G. 1993. Lipid and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A Review. *J. Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.
- YUDI, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA, D. SAJUTHI dan J. MANANGSANG. 2009. Biometri organ reproduksi bagian luar dan karakteristik ejakulat anoa (*Bubalus sp.*) yang dikoleksi menggunakan elektroejakulator. *Media Petern.* 32: 1-11.