

Pengaruh Jenis dan Aras Krioprotektan Terhadap Daya Hidup Spermatozoa Entog

KUSUMANINGRUM D.A., P. SITUMORANG, A.R. SETIOKO, T. SUGIARTI, E. TRIWULANNINGSIH dan R.G. SIANTURI

Balai Penelitian Ternak, PO BOX 221, Bogor 16002, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 22 Desember 2002)

ABSTRACT

KUSUMANINGRUM D. A., P. SITUMORANG, A. R. SETIOKO, T. SUGIARTI, E. TRIWULANNINGSIH and R. G. SIANTURI. 2002. Effect of cryoprotectant and its level to survivability of drake semen. *JITV* 7(4): 244-250.

This study was conducted at Laboratory Reproduction of Physiology, Research Institute of Animal Production. The experiment was factorial design with two kinds of cryoprotectant (DMF and DMA) as the first factor and two levels of them (7 and 9%) as the second factor. This study was invented to determine the effect of cryoprotectant and its level to survivability of drake semen. Sperm was collected from fifteen drakes two times per week using artificial vagina. Only the best quality of sperm was used in this study. Collected sperm was diluted in medium to get concentration of 400×10^6 per ml. Equilibrated at 5°C in mini straw (0.25 ml) for 60 minutes, then kept them up 8 cm above the LN_2 for 4 minutes before plunged in LN_2 . Parameters measured of this study were survivability of drake semen after diluted, at 5°C and after freezing-thawing at 35°C for 30 seconds. Result of this study showed that percentage of motility and percentage of live sperm were significant different ($P < 0.05$) between DMA (33.24 and 42.03) and DMF (25.82 and 34.30). Level of cryoprotectant (7 and 9%) were not significant different. Based on this study, using DMA as cryoprotectant with 7% in medium was better than that of DMF.

Key words: Cryoprotectant, survivability, drake sperm

ABSTRAK

KUSUMANINGRUM D. A., P. SITUMORANG, A. R. SETIOKO, T. SUGIARTI, E. TRIWULANNINGSIH dan R. G. SIANTURI. 2002. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap daya hidup spermatozoa entog. *JITV* 7(4): 244-250.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak-Ciawi, untuk mengetahui pengaruh jenis krioprotektan (DMF dan DMA) pada aras yang berbeda (7 dan 9%) terhadap daya hidup spermatozoa entog. Penelitian dilakukan dalam rancangan pola faktorial 2×2 , jenis krioprotektan merupakan faktor pertama sedangkan aras krioprotektan sebagai faktor kedua. Lima belas ekor entog jantan ditampung semennya dua kali seminggu menggunakan metode vagina buatan. Semen yang memenuhi syarat dikumpulkan menjadi satu dan diencerkan mencapai konsentrasi 400×10^6 per ml, diekuilibrasi dalam mini straw (0,25 ml) pada suhu 5°C selama 60 menit selanjutnya diletakkan 8 cm diatas permukaan N_2 cair selama 4 menit sebelum dimasukkan kedalam N_2 cair. Daya hidup spermatozoa diamati setelah diencerkan, diekuilibrasi dan di *thawing* pada suhu 35°C selama 30 detik. Hasil pengamatan menunjukkan persentase motilitas dan sperma hidup spermatozoa setelah *thawing* menggunakan krioprotektan DMA (33,24 dan 42,03%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan DMF (25,82 dan 34,30%). Aras krioprotektan (7 dan 9%) tidak memberikan hasil yang berbeda nyata baik pada motilitas maupun sperma hidup, meski ada tendensi aras 7% lebih baik. Disimpulkan penggunaan krioprotektan DMA dengan aras 7% akan menghasilkan daya hidup sperma yang lebih baik dibandingkan DMF.

Kata kunci: Krioprotektan, daya hidup, spermatozoa, entog

PENDAHULUAN

Daya hidup spermatozoa setelah ejakulasi pada suhu ruang sangat singkat, sehingga untuk memperpanjang daya hidupnya perlu dilakukan pengawetan. Pembekuan merupakan salah satu cara yang umum digunakan untuk memperpanjang daya hidup spermatozoa. Problem klasik dalam pembekuan sel hidup seperti spermatozoa adalah masalah yang berhubungan dengan *cold shock* dan kerusakan sel sebagai akibat terbentuknya kristal es pada fase beku. Untuk mengatasi hal tersebut dalam proses pembekuan sel ditambahkan agen protektif yang sering disebut sebagai krioprotektan. Fungsi

krioprotektan adalah mencegah terbentuknya kristal es dan menstabilkan membran plasma selama proses pembekuan (LEIBO, 1992). Pemberian agen protektif tersebut diharapkan dapat melindungi membran plasma dan isi sel secara keseluruhan dari kerusakan fisik dan fungsional pada saat dan selama proses pembekuan.

Krioprotektan yang paling umum digunakan dalam pembekuan sperma terutama pada mamalia adalah gliserol. Sementara itu, pada unggas lebih diarahkan pada krioprotektan lain seperti *Dimethyl formalimide* (DMF), *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), *1,2 propandiol*, *Dimethyl acetamide* (DMA) dan *Trehalosa* (KURBATOV, 1995; TSELUTIN *et al.*, 1995;

LUKASZEWICS, 1997; MYATA, 1998; SETIOKO *et al.*, 2000).

Penelitian SETIOKO *et al.* (2000) pada pembekuan spermatozoa itik dan entog menggunakan krioprotektan DMF, DMSO dan gliserol menghasilkan daya hidup spermatozoa setelah pembekuan yang lebih tinggi pada DMF dan DMSO dibandingkan dengan gliserol. Penelitian LUKASZEWICS (1997) pada spermatozoa Angsa White Italian yang dibekukan menggunakan larutan Avidulant dan Wenityp A dengan krioprotektan DMF, DMSO, Gliserol dan 1,2 propandiol menunjukkan bahwa persentase spermatozoa hidup tertinggi (26,3%) diperoleh apabila dibekukan menggunakan pelarut Avidulant-DMF. SAKATSKY *et al.* (1995) mendapatkan fertilitas yang tinggi pada aplikasi krioprotektan DMF dengan metode pembekuan cepat dalam preservasi semen angsa. Sementara fertilitas yang dicapai pada pembekuan spermatozoa ayam Barred Plymouth Rock dengan krioprotektan *methyl acetamide*, DMF dan DMSO masing-masing adalah 83, 80 dan 72% (MIYATA, 1998). Persentase fertilitas spermatozoa itik, angsa, ayam dan kalkun berturut-turut 69-90, 81-90 80-90 dan 78-85% diperoleh apabila semen dibekukan dengan metode pellet pada fluro-plastic dengan 4% DMA (TSELUTIN *et al.*, 1995). Angka fertilitas 93-94% diperoleh bila spermatozoa ayam White Leghorn dibekukan menggunakan krioprotektan DMA (TSELUTIN *et al.*, 1995). Data penggunaan krioprotektan DMA pada entog belum ditemukan.

Di sisi lain SETIOKO *et al.* (2000) melaporkan bahwa daya hidup maupun fertilitas spermatozoa entog yang didapatkan dengan DMF sampai saat ini belum memuaskan, sehingga perlu dilakukan usaha untuk meningkatkan daya hidup spermatozoa diantaranya dengan mencari alternatif krioprotektan lain. Data daya hidup spermatozoa entog yang dibekukan menggunakan krioprotektan DMA sampai saat ini juga belum ditemukan padahal di lain pihak angka fertilitas setelah pembekuan pada ayam dilaporkan sangat tinggi (TSELUTIN *et al.*, 1995). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penggunaan krioprotektan DMA dan DMF dengan aras yang berbeda terhadap daya hidup spermatozoa entog.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor, Jawa Barat, selama empat bulan. Lima belas ekor entog jantan dewasa dipelihara di dalam kandang individu, pakan konsentrat serta air minum diberikan secara *ad lib*. Ternak tersebut digunakan sebagai sumber semen. Semen ditampung dua kali seminggu menggunakan metode vagina buatan (TAN, 1980). Hanya semen yang

memenuhi syarat (minimal: ++, motilitas 70% dan tidak ada kontaminasi) digunakan dalam penelitian ini.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial 2 x 2. Faktor pertama adalah jenis krioprotektan (DMF dan DMA) sedangkan faktor kedua adalah aras krioprotektan yakni 7 dan 9%. Pemilihan jenis krioprotektan dan arasnya didasarkan pada data penelitian sebelumnya yaitu diperoleh daya hidup terbaik dengan krioprotektan DMF dengan aras 7%. Hasil yang diperoleh belum memuaskan sehingga dicari alternatif krioprotektan lain yaitu DMA, dimana berdasarkan pada data unggas lain hasilnya lebih memuaskan. Penggunaan DMA pada ayam sebesar 9%, menghasilkan fertilitas yang lebih baik.

Pengencer yang digunakan adalah pengencer penyangga fosfat yang dikembangkan oleh SEXTON (1978) dikenal sebagai BPSE (*Betsville Poultry Semen Extender*). Komposisi pengencer BPSE dan krioprotektan yang ditambahkan tersaji dalam Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi dasar bahan pengencer dan krioprotektan semen

Bahan pengencer dan krioprotektan	Kadar
Krioprotektan : DMA (%)	7 dan 9
DMF (%)	7 dan 9
Fructosa (g)	0,50
Natrium glutamat (H ₂ O)(g)	0,867
Natrium asetat (3H ₂ O) (g)	0,430
Magnesium chlorida (6H ₂ O) (g)	0,034
Kalium monofosfat (anhydrous) (g)	0,75
Dipotassium hidrogen fosfat (3H ₂ O) (g)	1,270
Tripotassium sitrat (H ₂ O) (g)	0,064
Tris (g)	0,195
Penisilin (IU)	5000
Streptomycin (mg)	50
Akuabides 9 ml)	100

Semen segar yang diperoleh diamati secara makroskopis, yaitu dengan mengukur volume, melihat warna, konsistensi, dan adanya kontaminasi darah atau kotoran. Semen yang terlalu encer atau terkontaminasi tidak digunakan dalam penelitian ini. Sementara itu, pengujian mikroskopis dilakukan dengan melihat persentase motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa. Selanjutnya semen tersebut di pool, dan disimpan dalam ruang pendingin pada suhu 5°C. Untuk menentukan derajat pengenceran konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan haemocytometer. Setelah itu semen diencerkan dengan larutan pengencer (Tabel 1), semen kemudian diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama 60 menit kemudian dimasukkan dalam polystyrene straw (0,25 ml) dan ditutup dengan serbuk PVC. Pembekuan dilakukan

dengan cara meletakkan rak berisi straw di atas uap N₂ cair (suhu - 110°C) selama empat menit, kemudian langsung dimasukkan ke dalam N₂ cair. Setelah penyimpanan selama kurang lebih satu minggu, contoh semen diambil dan dicairkan kembali (*thawing*) pada suhu 35°C selama 30 detik. Contoh semen yang telah *dithawing* diuji secara mikroskopis untuk mengetahui persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa dengan metode pewarnaan eosin-negrosin.

Penelitian dilakukan dalam delapan kali ulangan dan parameter yang diukur adalah daya hidup spermatozoa meliputi motilitas (%) dan persentase hidup (%) setelah diencerkan, setelah ekuilibrisasi dan setelah *thawing*. Penurunan daya hidup spermatozoa dihitung dengan cara mengurangkan baik persentase motilitas maupun persentase hidup spermatozoa setelah diencerkan dengan setelah *thawing*. *Recovery rate* baik persentase motilitas maupun persentase hidup spermatozoa dihitung menurut HAFEZ (2000) yaitu motilitas setelah *thawing* dibagi setelah diencerkan dikalikan seratus persen.

Semua data yang diperoleh kecuali data semen segar dianalisis statistik menggunakan ANOVA (SAS, 1987).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

Rataan karakteristik semen segar entog yang telah dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis disajikan pada Tabel 2.

Rata-rata kualitas semen segar entog menunjukkan bahwa semen segar yang diperoleh layak untuk diproses lebih lanjut dalam berbagai tahap proses pembekuan. Rata-rata volume (0,97 ± 0,10 ml) dan konsentrasi

semen (1.395,6 ± 320,7 juta/ml) yang diperoleh pada kegiatan ini lebih rendah dibandingkan dengan yang didapatkan TAN (1980) yaitu 1,08 ml, 1930 juta/ml dan 1,2 ml, 2000 juta/ml (TAI *et al.*, 1997). Hal ini disebabkan oleh perbedaan umur, frekuensi penampungan, metode penampungan dan manajemen pakan yang diberikan.

Persentase motilitas spermatozoa

Hasil analisis statistik menunjukkan tidak ada pengaruh interaksi antara jenis dan aras krioprotektan baik setelah pengenceran, ekuilibrisasi maupun *thawing* terhadap persentase motilitas spermatozoa. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan pada tiga waktu pengamatan terhadap motilitas spermatozoa entog tersaji pada Tabel 3.

Tabel 2. Rataan kualitas semen segar entog yang digunakan selama penelitian

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	0,97 ± 0,10
Warna	Putih
Konsistensi	Agak kekentalan
Derajat keasaman (pH)	6,95 ± 0,09
Gerakan massa	(++++/+++)
Persentase motilitas (%)	80,00 ± 0,00
Persentase hidup (%)	91,00 ± 2,07
Konsentrasi (juta sel/ml)	1.395,6 ± 320,7
Persentase abnormalitas (%)	6,37 ± 2,38

Tabel 3. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap persentase motilitas spermatozoa entog

Waktu evaluasi	Aras	Persentase motilitas		Rata-rata
		DMF	DMA	
Setelah pengenceran	7%	74,53	76,41	75,47
	9%	75,56	76,41	76,48
	Rata-rata	75,55	76,41	
Setelah ekuilibrisasi	7%	63,64	70,04	66,84
	9%	63,08	67,88	65,48
	Rata-rata	63,36 ^b	68,96 ^a	
Setelah <i>thawing</i>	7%	25,16	36,63	30,89
	9%	26,48	29,84	28,16
	Rata-rata	25,82 ^b	33,24 ^a	

^{a,b} Superskrip berbeda pada baris yang sama berbeda nyata (P<0,05)

Pada tahap pengenceran, kedua faktor perlakuan tidak menghasilkan persentase motilitas yang berbeda nyata, tetapi pada tahap berikutnya yaitu setelah ekuilibrisasi dan *thawing* jenis krioprotektan DMA menghasilkan persentase motilitas yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan persentase motilitas menggunakan DMF. Motilitas spermatozoa dengan krioprotektan DMA yang diperoleh pada penelitian ini sejalan dengan hasil yang dilaporkan oleh TAI *et al.* (1983) pada kriopreservasi semen angsa, yang memperoleh nilai motilitas 35% dengan krioprotektan DMA 9%.

Hal tersebut mengindikasikan bahwa DMA memegang peranan yang penting dalam melindungi spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan dan *thawing*. *Dimethylacetamide* sebagai krioprotektan intraseluler berfungsi melindungi keutuhan membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan akibat terbentuknya kristal es selama pembekuan. Hasil tersebut diperkuat oleh *recovery rate* DMA (Tabel 4) yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan DMF (43,82 vs 33,92%). Menurut HAZEZ (2000) *recovery rate* diamati untuk mengevaluasi pengaruh krioprotektan terhadap daya hidup sel setelah proses kriopreservasi. Penurunan motilitas (%) selama pengenceran, pembekuan sampai dengan dicairkan kembali pada DMF lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan DMA (Table 4). Nilai tersebut menunjukkan bahwa kemampuan DMA dalam melindungi sel sperma selama proses pendinginan, pembekuan dan pencairan kembali lebih baik apabila dibandingkan dengan DMF. Meskipun kedua krioprotektan yang digunakan adalah jenis krioprotektan intraseluler, namun keduanya memiliki karakteristik kimiawi yang berbeda. DMF mempunyai berat molekul (BM) 73,10 dengan berat jenis (BJ) 0,95 g/cm³ dan sangat stabil pada larutan yang bebas asam-basa serta sangat mudah larut dalam air (FURNISS *et al.*, 1979). DMA merupakan senyawa dengan BM 87,12 dan BJ 0,94 g/cm³ merupakan larutan yang mudah larut dalam air, alkohol, ether, acetone, benzene dan larutan lain (WEAST dan ASTLE, 1978),

mempunyai kemampuan penetrasi yang baik pada sel-sel dengan kandungan lipid membran tinggi (MERYMAN, 1966).

Persentase motilitas yang tinggi pada DMA dibandingkan dengan DMF diduga disebabkan oleh kemampuan interaksi antara krioprotektan DMA dengan membran sel yang lebih baik dibandingkan dengan DMF. Kemampuan proteksi krioprotektan terhadap membran sel merupakan indikasi dari interaksi yang berjalan baik antara krioprotektan dan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat dan juga pada saat kembali ke struktur yang relatif cair selama proses pencairan. Membran plasma yang rusak akan menyebabkan proses metabolisme terganggu dan berakibat buruk terhadap motilitas spermatozoa. Interaksi krioprotektan dengan membran sel dapat berupa kelenturan membran, tidak rapuh, sehingga kerusakan irreversible karena retak dapat diatasi (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992).

Faktor lain yang kemungkinan menyebabkan motilitas spermatozoa lebih baik dengan krioprotektan DMA adalah kemampuan DMA menjaga keseimbangan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel. Peningkatan konsentrasi larutan baik di dalam maupun di luar sel akan menyebabkan perubahan yang irreversible dalam struktur membran, denaturasi protein, kerusakan struktur internal dalam axoneme dan pengeluaran protein dari permukaan eksternal membran plasma (AMAN, 1999). Disamping itu, kemampuan berdifusi keluar masuk sel yang dimiliki oleh DMA juga diduga mempunyai pengaruh langsung terhadap proteksi membran sel dan organel intraseluler lain. Kemampuan berdifusi ini akan mencegah pembentukan kristal-kristal es intraseluler maupun ekstraseluler yang berukuran besar selama proses pembekuan. MERYMAN (1966), melaporkan bahwa DMA mempunyai kemampuan protektif yang lebih luas dalam berbagai jenis sel dengan kandungan lipid membran yang banyak, yang tidak permeabel bagi krioprotektan lain seperti dimethyl sulphoxide (DMSO) atau gliserol.

Tabel 4. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap penurunan motilitas (%) dari tahap pengenceran sampai *thawing* dan *recovery rate* pembekuan spermatozoa

Pengamatan	Aras	Persentase motilitas		Rata-rata
		DMF	DMA	
Penurunan motilitas	7%	49,38	39,77	44,58
	9%	50,08	46,57	48,32
	Rata-rata	49,72 ^a	43,17 ^b	-
<i>Recovery rate</i>	7%	33,29	48,41	40,85
	9%	34,56	39,24	36,90
	Rata-rata	33,92 ^b	43,82 ^a	-

^{a,b}Superskrip berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($P<0,05$)

Walaupun secara statistik menunjukkan tidak adanya interaksi antara semua faktor perlakuan namun secara rata-rata mengindikasikan adanya variasi persentase motilitas antara kedua perlakuan konsentrasi dengan perbedaan jenis krioprotektan pada semua waktu evaluasi. Rataan persentase motilitas setelah pengenceran dengan konsentrasi 9% pada krioprotektan DMF terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi 7%. Akan tetapi setelah ekuilibrisasi dan setelah pembekuan, persentase motilitas antara kedua konsentrasi relatif sama. Pada krioprotektan DMA menunjukkan hasil yang sebaliknya, dimana persentase motilitas setelah ekuilibrisasi dan setelah pembekuan dengan konsentrasi 7% sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan 9%. Sementara itu, setelah pengenceran persentase motilitas yang diperoleh sama antara kedua konsentrasi krioprotektan DMA. Hasil ini

mengindikasikan bahwa dengan konsentrasi 7% pada DMA akan memberikan kemampuan protektif secara optimal terhadap laju metabolisme spermatozoa, sementara dengan peningkatan konsentrasi sampai dengan 9% akan memberikan titik kritis (ditunjukkan dengan persentase daya hidup yang lebih rendah) bagi perlindungan spermatozoa. Hal ini terjadi karena DMA merupakan krioprotektan intraselluler, sehingga pada konsentrasi yang tinggi akan menyebabkan terjadinya keracunan sel (TSELUTIN *et al.*, 1999).

Persentase hidup spermatozoa

Pengaruh perlakuan krioprotektan DMA dan DMF masing-masing 7% dan 9% terhadap persentase hidup spermatozoa entog disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap persentase hidup spermatozoa entog pada waktu evaluasi yang berbeda

Waktu evaluasi	Aras	Persentase hidup		Rata-rata
		DMF	DMA	
Setelah pengenceran	7%	86,25	87,88	87,06
	9%	87,44	87,50	87,47
	Rata-rata	86,84	87,69	–
Setelah ekuilibrisasi	7%	80,75	83,31	82,03
	9%	81,56	81,06	81,31
	Rata-rata	81,6	82,19	–
Setelah <i>thawing</i>	7%	34,50	45,38	39,94
	9%	34,50	38,69	36,59
	Rata-rata	34,50 ^b	42,03 ^a	–

^{a,b} Superskrip berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

Tabel 6. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap penurunan persentase hidup spermatozoa dari tahap pengenceran sampai *thawing* dan nilai *recovery rate* setelah pembekuan

Pengamatan	Aras	Persentase hidup		Rata-rata
		DMF	DMA	
Penurunan persentase hidup	7%	51,75	42,50	47,13
	9%	52,94	48,81	50,88
	Rata-rata	52,34 ^a	45,66 ^b	–
<i>Recovery rate</i>	7%	40,09	51,72	45,91
	9%	39,55	44,36	42,01
	Rata-rata	39,88 ^a	48,04 ^a	–

^{a,b} Superskrip berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh nyata dari interaksi antara jenis dan aras krioprotektan terhadap persentase hidup spermatozoa pada ketiga waktu evaluasi semen. Pada tahap setelah pengenceran dan setelah ekuilibrasi, kedua faktor perlakuan tidak menunjukkan pengaruh nyata, tetapi setelah *thawing*, DMA menghasilkan persentase spermatozoa hidup (42,03%) yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan DMF yaitu 34,50% (Tabel 5). Hasil ini didukung dari analisis statistik pada tingkat penurunan persentase hidup spermatozoa dari pengenceran ke tahap *thawing* dimana hanya jenis krioprotektan yang memberikan pengaruh nyata ($P < 0,05$) sedangkan aras krioprotektan memperlihatkan pengaruh yang tidak nyata terhadap penurunan persentase hidup spermatozoa (Tabel 6).

Tingginya persentase hidup spermatozoa pada krioprotektan DMA dibandingkan dengan DMF diduga disebabkan karena kemampuan DMA untuk memproteksi membran plasma spermatozoa lebih baik dibandingkan dengan DMF. Dengan terpeliharanya keutuhan fisik membran plasma spermatozoa sekaligus fungsinya, maka proses metabolisme (basal) dari spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan dan selama penyimpanan di dalam N_2 cair akan tetap berlangsung dengan baik, sehingga menjaga kelangsungan hidupnya. Membran plasma juga berfungsi menjaga keseimbangan elektrolit- elektrolit intra dan ekstraseluler spermatozoa. Apabila membran plasma rusak, keseimbangan elektrolit tersebut akan terganggu yang berakibat buruk terhadap proses-proses biokimiawi yang terjadi di dalam sel spermatozoa, yang pada akhirnya akan mengakibatkan kematian.

Selain itu karena DMA adalah krioprotektan intraseluler, kemungkinan mekanisme kerja DMA dalam memberikan perlindungan sel spermatozoa selama pembekuan relatif sama dengan yang terjadi pada gliserol. Seperti dijelaskan TOELIHERE (1985), gliserol akan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan akan dipakai oleh spermatozoa untuk metabolisme oksidatif, menggantikan air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit- elektrolit, menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler serta mengurangi daya rusaknya terhadap sel spermatozoa. Selain itu, gliserol akan menurunkan konsentrasi natrium di dalam medium di luar sel sehingga kematian sel spermatozoa akibat efek larutan dapat dihindarkan dan pembentukan kristal- kristal es di dalam sel dapat dikurangi. Mekanisme kerjanya adalah dengan jalan mengubah bentuk dan ukuran kristal es yang terbentuk sehingga mengurangi tekanan mekanik dan menurunkan titik beku medium sehingga kristal- kristal es tidak terbentuk. Efek larutan ini akan timbul bila terjadi perubahan yang drastis dari larutan dalam sel yang dibekukan sebagai akibat terbentuknya kristal- kristal es di luar dan dalam sel spermatozoa. Selain itu terjadi penurunan volume air

dalam sel, perubahan air menjadi es dan adanya peningkatan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel spermatozoa. Adanya gliserol dalam medium pengencer diharapkan peningkatan konsentrasi elektrolit di atas level yang merugikan dapat dihindarkan (KUMAR *et al.*, 1992).

KESIMPULAN

Krioprotektan DMA memberikan respon yang lebih baik dalam melindungi sel spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan dan pencairan kembali. Aras krioprotektan 7% cenderung lebih baik dibandingkan dengan 9%, sehingga untuk pembekuan spermatozoa entog disarankan untuk menggunakan DMA dengan aras 7%.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada teknisi Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan Kandang itik, Balai Penelitian Ternak serta M. Gazali (alm) atas kerjasamanya selama mengumpulkan data penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- AMAN R. P. 1999. Cryopreservation of semen. *In: Encyclopedia of Reproduction*. Vol 1. Academic Press, London. pp. 772-783.
- FURNISS BS., HANNAFORD AJ. ROGER V. SMITH PWG., and TATCHELL AR. 1979. Vogel's Text Book of Proctical Organic Chemistry. 4thed. ELBS. England.
- HAFEZ, E.S.E. 2000. Preservation and cryopreservation of gamet and embryo. *In: Reproduction in farm animals*. B. HAFEZ/E.S.E. HAFEZ (Ed.). 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. USA.
- KUMAR S, SAHNI KL. and MOOHAN G. 1992. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodiun citrate buffers. *Buffalo j*.2:151-156.
- KURBATOV AD. 1985. Low temperature storage of fowl semen. *Cryobiology*. 3:13-15.
- LEIBO, S.P. 1992. A one-step method for direct non surgical transfer of frozen thawed bovine embryo. *Theriogenology* 21: 767-787.
- LUKASZEWICS, E. 1997. Cryopreservation of the white italian (Anser-anser) gender semen. Proceeding 11th of European Symposium of Waterfowl. Nantes. (France) September 8-10, 1997. pp: 442-448.
- MERYMAN, HT. 1966. *Cryobiology*. Academic Press Inc. London. pp: 205.
- MİYATA, T. 1998. Recent development in semen cryopreservation technology in poultry. *Livestock Technology*. Vol 3: 54-58.

- SAKHATSKY, NI; ANDREYEV VI, and ARTEMENKO AB. 1995. Technology of goose semen low temperature conservation. Proceeding of the 10th European Symposium on Waterfowl. Halle. pp:226-228.
- SETIOKO, A.R.; P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI dan D.A. KUSUMANINGRUM. 2000. Pengaruh krioprotektan dan waktu ekuilibrasi terhadap kualitas dan fertilitas spermatozoa itik dan entog. Balai Penelitian Ternak (*Unpublished*).
- SAS. 1987. SAS User's Guide: Statistical. Carry. N.C. SAS Institute Inc.
- SEXTON TJ. 1978. A new poultry semen extender 3. Effect of storage condition on fertilizing capacity of chicken semen stored at 5°C. *J. Poult. Sci* 57:285-289.
- SUPRIATNA I. dan PASARIBU FH. 1992. In vitro fertilization, transfer embrio dan pembekuan embrio. PAU Bioteknologi IPB.
- TAI, JIL. TAI C. SU YM, HUANG HH, TERADA T, and WATANABE. M. 1983. Studies on the cryopreservation of drake semen. Proceeding of 5th World Congress on Animal Production. Tokyo. Vol 2. pp. 183-184.
- TAI C, CENG YS, LEE SR, WANG CT, and SHEN TF. 1997. The study of drake researches in Republic of China on Taiwan. Proceeding of 11th European Symposium on Waterfowl. France. pp: 43-57.
- TAN N.S. 1980. The training of drakes for semen collection. *Ann. Zootech.* 29. (293-102).
- TOELIHERE, M. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak, Angkasa Bandung.
- TSELUTIN, K., NURUBINA L, MAVRODINA F, and TUR B. 1995. Cryopreservation of poultry semen. *Br. Poult. Sci.* 36 (5):805-811.
- WEAST RC. and ASTLE MJ. 1978. CRC. Handbook of Chemistry and Physics. A Ready Reference Data of Chemical and Physical Data. CRC Press Inc, Florida.