

Peranan Plasma Semen dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Asal Epididimis Domba yang Disimpan pada Suhu Rendah (3–5°C)

MUHAMMAD RIZAL^{1*}, MAMAN SURACHMAN², HERDIS², dan ACHMAD SELAMET AKU³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon 97233

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

³Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

*E-mail: icang65@yahoo.com

(Diterima dewan redaksi 29 Juni 2006)

ABSTRACT

RIZAL, M., M. SURACHMAN, HERDIS and A.S. AKU. 2006. Role of seminal plasma in maintaining quality of ram epididymal spermatozoa preserved at low temperature (3–5°C). *JITV* 11(4): 287-294.

Caudal epididymal spermatozoa could be used as an alternative source of gamete in the application of various reproductive technologies, because the spermatozoa is motile and has ability of fertilizing the oocyte. The purpose of this research was to examine the effect of seminal plasma addition on the quality of ram caudal epididymal spermatozoa preserved at 3–5°C. Collected-spermatozoa was divided into five tubes then centrifuged at 3,000 rpm for 30 min and the supernatant was removed. One-of the five tubes was diluted with Tris extender (Tris) and 0.5 ml ram seminal plasma was added into the other tubes then diluted with Tris extender (PS-Tris), 15% AndroMed + 85% distilled water (PS-AM15), 20% AndroMed + 80% distilled water (PS-AM20), and 25% AndroMed + 75% distilled water (PS-AM25), respectively. Quality of collected-spermatozoa were observed based on spermatozoa concentration (SC), percentages of motile spermatozoa (MS), live spermatozoa (LS), abnormal spermatozoa (AS), cytoplasmic droplet (CD), and intact plasma membrane (IPM). Percentages of MS, LS, and IPM of diluted-spermatozoa was evaluated every day during storage at 3–5°C for three days. Results of this study showed that mean SC, MS, LS, AS, CD, and IPM of fresh spermatozoa were 11,660 million/ml, 65, 81, 7.6, 10.2, and 82.2%, respectively. Addition of seminal plasma into cauda epididymal spermatozoa prior to dilution could maintain the quality of spermatozoa during storage at 3–5°C for three days. At day-4 of storage, the percentages of MS, LS, and IPM for PS-Tris (43, 58, and 59.2%), PS-AM20 (40.5, 53.75, and 53.75%), and PS-AM25 (40, 54.8, and 55.2%) were significantly ($P<0.05$) higher than Tris (21, 34.8, and 33.6%) and PS-AM15 (20, 40, and 42.2%). In conclusion, addition of seminal plasma of cauda epididymal spermatozoa prior to dilution with Tris or 20 and 25% AndroMed extenders could maintain the quality of spermatozoa during storage at 3–5°C for three days, and could be used for artificial insemination or *in vitro* embryo production programs.

Key Words: Caudal Epididymal Spermatozoa, Seminal Plasma, Tris, AndroMed, Ram

ABSTRAK

RIZAL, M., M. SURACHMAN, HERDIS dan A.S. AKU. 2006. Peranan plasma semen dalam mempertahankan kualitas spermatozoa asal epididimis domba yang disimpan pada suhu rendah (3–5°C). *JITV* 11(4): 287-294.

Spermatozoa asal *cauda* epididimis dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif sumber gamet dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi, karena spermatozoa tersebut telah motil dan memiliki kemampuan membuahi oosit. Tujuan penelitian ini adalah menguji pengaruh penambahan plasma semen terhadap kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba yang disimpan pada suhu 3–5°C. Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam lima buah tabung reaksi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm selama 30 menit dan supernatan dibuang. Tabung pertama diencerkan dengan pengencer Tris (Tris), sedangkan ke dalam empat buah tabung reaksi lainnya masing-masing ditambahkan 0,5 ml plasma semen domba kemudian diencerkan dengan pengencer Tris (PS-Tris), 15% AndroMed + 85% akuabidestilata (PS-AM15), 20% AndroMed + 80% akuabidestilata (PS-AM20), dan 25% AndroMed + 75% akuabidestilata (PS-AM25). Evaluasi kualitas spermatozoa segar adalah meliputi konsentrasi spermatozoa (KS), persentase spermatozoa motil (SM), spermatozoa hidup (SH), spermatozoa abnormal (SA), butiran sitoplasma (BS), dan membran plasma utuh (MPU). Persentase SM, SH, dan MPU dievaluasi setiap hari selama semen disimpan tiga hari pada suhu 3–5°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata KS, SM, SH, SA, BS, dan MPU spermatozoa segar adalah masing-masing 11.660 juta sel/ml, 65; 81; 7,6; 10,2 dan 82,2%. Penambahan plasma semen ke dalam spermatozoa asal *cauda* epididimis sebelum diencerkan mampu mengurangi penurunan kualitas spermatozoa selama semen disimpan tiga hari pada suhu 3–5°C. Pada hari keempat penyimpanan, persentase SM, SH, dan MPU perlakuan PS-Tris (43; 58 dan 59,2%), PS-AM20 (40,5; 53,75 dan 53,75%), dan PS-AM25 (40; 54,8 dan 55,2%) nyata ($P<0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan Tris (21; 34,8 dan 33,6%) dan PS-AM15 (20; 40 dan 42,2%). Dapat disimpulkan bahwa penambahan plasma semen ke dalam spermatozoa asal *cauda* epididimis domba sebelum diencerkan dengan pengencer Tris atau 20 dan 25% AndroMed dapat mempertahankan kualitas spermatozoa selama semen disimpan tiga hari pada suhu 3–5°C, dan memenuhi syarat dimanfaatkan dalam program inseminasi buatan dan produksi embrio secara *in vitro*.

Kata Kunci: Spermatozoa Asal *Cauda* Epididimis, Plasma Semen, Tris, AndroMed, Domba

PENDAHULUAN

Spermatozoa yang ada di bagian *cauda* epididimis telah melewati proses pematangan di bagian *caput* dan *corpus* epididimis serta sudah memiliki kemampuan bergerak (motil) (AXNER *et al.*, 1999), dan mampu membuahi oosit (SENGER, 1999; HAFEZ dan HAFEZ, 2000). Proses pematangan tersebut ditandai oleh berpindahannya posisi butiran sitoplasma dari bagian proksimal ke arah distal ekor atau hilang sama sekali dari sel spermatozoa (TOELIHERE, 1993). TOLLNER *et al.* (1990), SANKAI *et al.* (1994), dan FERADIS *et al.* (2001) berhasil membekukan spermatozoa asal *cauda* epididimis monyet ekor panjang yang diaspirasi dari hewan hidup. ANEL *et al.* (1999) berhasil membekukan spermatozoa asal *cauda* epididimis beruang coklat *cantabric* yang dikoleksi dari hewan mati. Dilaporkan bahwa angka kebuntingan hasil inseminasi buatan (IB) dengan spermatozoa asal *cauda* epididimis yang telah dibekukan pada llama dan alpaca (sejenis unta) sebesar 37,5% (BRAVO *et al.*, 2000) dan 44,44% pada domba Garut (RIZAL, 2006). Oleh karena itu pemanfaatan spermatozoa yang dikoleksi dari *cauda* epididimis menjadi metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang memiliki kualitas genetik unggul tetapi tidak dapat ditampung semennya karena berbagai alasan, seperti tidak bersedia melayani vagina buatan, tidak respons terhadap elektroejakulator dan masase, pincang, atau sebab-sebab lain yang menyebabkan hewan tersebut tidak mau kawin. Metode ini juga akan sangat membantu dalam upaya menyelamatkan plasma nutfah ternak atau hewan jantan yang mati secara mendadak, serta terhadap hewan-hewan langka yang sedang ditangkarkan tetapi tidak dapat kawin secara normal karena kondisi tempat penangkaran yang tidak sesuai dengan kondisi habitat aslinya.

Untuk memperpanjang daya hidup spermatozoa yang dikoleksi dari *cauda* epididimis, spermatozoa harus diencerkan dengan pengencer yang mampu menjaga kualitas selama penyimpanan pada suhu rendah. Jenis pengencer yang telah lazim digunakan dalam upaya memperpanjang daya hidup spermatozoa adalah pengencer Tris yang ditambahkan kuning telur. Lesitin yang ada di dalam kuning telur merupakan target utama penambahan kuning telur ke dalam pengencer semen. Menurut TOELIHERE (1993) lesitin berfungsi melindungi spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) selama semen disimpan pada suhu rendah (3–5°C). Namun demikian, dewasa ini muncul kekhawatiran bahwa penambahan kuning telur di dalam pengencer semen akan menjadi media penyebaran kuman penyakit menular, karena mengandung berbagai mikroorganisme. BOUSSEAU *et al.* (1998) melaporkan bahwa pengencer semen komersial yang mengandung kuning telur seperti

Triladyl dan Laiciphos terkontaminasi oleh bakteri atau mycoplasma sebanyak 10–60 CFU ml⁻¹. Selanjutnya dinyatakan bahwa pengencer komersial yang tidak mengandung kuning telur seperti Biociphos plus tidak terkontaminasi bakteri. FRONING (1998) melaporkan bahwa telur ayam ras mengandung *Salmonella typhimurium* sebanyak rata-rata 67,09 CFU ml⁻¹. Salah satu pengencer komersial yang tidak mengandung kuning telur adalah AndroMed produksi Minitübe Jerman. Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah dikemas dalam bentuk paket siap pakai.

Umumnya kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis yang telah diolah dalam bentuk semen cair-dingin atau semen beku lebih rendah dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Hal ini diduga karena spermatozoa epididimis tidak disertai dengan plasma semen. Menurut NOLAN dan HAMMERSTEDT (1997) plasma semen mengandung berbagai makromolekul dan zat nutrien yang berfungsi menjaga integritas sel spermatozoa. Oleh karena itu, menurut GRAHAM (1994) dan SQUIRES *et al.* (2000) salah satu metode yang dapat dilakukan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis yang akan dibekukan adalah dengan menambahkan plasma semen sebelum spermatozoa diencerkan.

Dalam proses preservasi dan kriopreservasi semen, kualitas spermatozoa semaksimal mungkin harus dipertahankan agar tetap memenuhi syarat dimanfaatkan dalam program IB dan produksi embryo secara *in vitro* (PEIV). Standar Nasional Indonesia (SNI) mensyaratkan bahwa semen yang layak dimanfaatkan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%.

Pada penelitian ini dilakukan upaya menjaga kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba yang disimpan pada suhu 3–5°C dengan cara menambahkan plasma semen sebelum diencerkan dengan pengencer Tris dan AndroMed. Diharapkan bahwa penambahan plasma semen dan penggunaan pengencer semen komersial seperti AndroMed dalam proses preservasi spermatozoa asal *cauda* epididimis domba selain dapat mempertahankan kualitas spermatozoa yang telah diolah, juga dapat mencegah penyebaran kuman penyakit menular yang mungkin terdapat di dalam kuning telur.

MATERI DAN METODE

Materi percobaan

Testis beserta epididimis domba yang telah dipotong sebanyak lima buah (merupakan jumlah ulangan) diperoleh dari rumah pemotongan hewan (RPH) tradisional di Bogor. Epididimis dipisahkan dari testis

kemudian dibersihkan dan dimasukkan ke tabung gelas yang telah diisi dengan larutan NaCl fisiologik dan ditutup rapat, kemudian dibawa ke laboratorium dalam kondisi suhu lingkungan. Setelah tiba di laboratorium, spermatozoa dikoleksi dari bagian *cauda* epididimis dengan cara membuat sayatan-sayatan menggunakan gunting steril kemudian dibilas-tekan dengan larutan NaCl fisiologik sebanyak 5 ml (RIZAL, 2004).

Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam lima buah tabung reaksi dengan volume yang sama, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit (RIZAL, 2004). Supernatan pada tabung pertama dibuang dan pellet (spermatozoa) diencerkan dengan pengencer Tris (Tris). Supernatan pada tabung kedua, ketiga, keempat, dan kelima dibuang dan diganti dengan plasma semen domba masing-masing sebanyak 0,5 ml. Plasma semen dipisahkan dari spermatozoa dengan mensentrifugasi semen pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit sebanyak dua kali. Plasma semen dikoleksi dari beberapa ekor domba kemudian disatukan di dalam tabung reaksi dan disimpan pada *freezer* lemari es. Sebelum digunakan, plasma semen dicairkan kembali dan dibiarkan pada suhu ruang sesuai dengan suhu spermatozoa *cauda* epididimis hasil koleksi. Semen pada tabung kedua diencerkan dengan pengencer Tris (PS-Tris). Semen pada tabung ketiga diencerkan dengan pengencer komersial 15% AndroMed + 85% akuabidestilata (PS-AM15). Semen pada tabung keempat diencerkan dengan pengencer komersial 20%

AndroMed + 80% akuabidestilata (PS-AM20). Semen pada tabung kelima diencerkan dengan pengencer komersial 25% AndroMed + 75% akuabidestilata (PS-AM25) (Tabel 1). Semen diencerkan hingga mencapai konsentrasi 100 juta spermatozoa motil per ml.

Kelima tabung reaksi yang berisi spermatozoa yang telah diencerkan dengan masing-masing pengencer perlakuan ditutup rapat dan dimasukkan ke gelas piala berisi air bersih. Selanjutnya gelas piala tersebut disimpan di dalam lemari es pada suhu 3–5°C selama tiga hari.

Evaluasi kualitas spermatozoa

Kualitas spermatozoa dievaluasi segera setelah dikoleksi dan setelah perlakuan. Kualitas spermatozoa yang dievaluasi segera setelah dikoleksi (karakteristik spermatozoa segar) adalah konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, spermatozoa abnormal, spermatozoa yang memiliki butiran sitoplasma dan membran plasma utuh (MPU). Peubah kualitas spermatozoa yang dievaluasi setelah perlakuan adalah: persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup dan MPU; dievaluasi setiap hari selama tiga hari penyimpanan pada suhu 3–5°C.

Konsentrasi spermatozoa: Konsentrasi spermatozoa hasil koleksi sebelum dibilas-tekan dengan larutan NaCl fisiologik, dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer.

Tabel 1. Komposisi perlakuan

Bahan	Perlakuan				
	Tris	PS-Tris	PS-AM15	PS-AM20	PS-AM25
Plasma semen (ml)	-	0,5	0,5	0,5	0,5
Tris(hidroksimetil)aminometan (g)	3,32	3,32	-	-	-
Asam sitrat-monohidrat (g)	1,86	1,86	-	-	-
D(-)Fruktosa (g)	1,37	1,37	-	-	-
Penisilin-G ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1000	1000	-	-	-
Streptomisin-sulfat ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	1000	1000	-	-	-
Kuning telur ayam ras (ml, v v ⁻¹)	20	20	-	-	-
AndroMed (ml, v v ⁻¹)	-	-	15	20	25
Akuabidestilata, ad (ml)	100	100	100	100	100

Tris = perlakuan pengencer Tris tanpa penambahan plasma semen
 PS-Tris = perlakuan plasma semen + pengencer Tris
 PS-AM15 = perlakuan plasma semen + pengencer 15% AndroMed
 PS-AM20 = perlakuan plasma semen + pengencer 20% AndroMed
 PS-AM25 = perlakuan plasma semen + pengencer 25% AndroMed

Persentase spermatozoa motil: Persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Ditentukan secara subjektif hasil rata-rata evaluasi pada delapan lapang pandang dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5% (TOELIHERE, 1993).

Persentase spermatozoa hidup: Persentase spermatozoa yang hidup, ditentukan dengan pewarnaan 2% eosin B (TOELIHERE, 1993). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Persentase spermatozoa abnormal dan butiran sitoplasma dievaluasi dengan preparat yang digunakan untuk mengevaluasi persentase spermatozoa hidup. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi untuk masing-masing peubah dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Persentase MPU: Persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh, dievaluasi dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) atau *hypoosmotic swelling* (HOS) *test* (REVELL dan MRODE, 1994). Komposisi larutan hypoosmotik terdiri atas 0,9 g fruktosa dan 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 200 μ l larutan hypoosmotik ditambah dengan 20 μ l semen diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit, kemudian buat preparat ulas tipis dan amati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x 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 dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk Rancangan Acak Lengkap dengan lima perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik spermatozoa segar

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi spermatozoa segar rata-rata 11.660 juta sel ml^{-1} (berkisar antara 10.390 dan 12.420 juta sel ml^{-1}) (Tabel 2). Hasil yang diperoleh masih dalam kisaran jumlah seperti yang dilaporkan SENER (1999) bahwa konsentrasi spermatozoa di bagian *cauda* epididimis hewan mamalia sebanyak 10.000–50.000 juta sel ml^{-1} . Akan tetapi, hasil yang diperoleh ini lebih rendah

dibandingkan dengan yang dilaporkan beberapa peneliti sebelumnya. Konsentrasi spermatozoa di bagian *cauda* epididimis domba sebesar 37.000–63.000 juta sel ml^{-1} (TOMES *et al.*, 1979) dan sebanyak rata-rata 13.993,33 juta sel ml^{-1} (berkisar antara 13.530 dan 14.520 juta sel ml^{-1}) pada domba Garut (RIZAL *et al.*, 2004a).

Persentase spermatozoa motil yang diperoleh pada penelitian ini adalah rata-rata 65%, sedangkan persentase spermatozoa hidup rata-rata 81% (kisaran 79–83%) (Tabel 2). RIZAL *et al.* (2004a) melaporkan persentase motilitas dan hidup spermatozoa asal *cauda* epididimis domba Garut masing-masing rata-rata 70,83 dan 82,83%. Hasil beberapa penelitian melaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis setelah diencerkan sebesar 50–80% pada domba (SENGER, 1999), 70–75% pada badak (LUBBE *et al.*, 1999), 38–77% pada kuda (SQUIRES *et al.*, 2000), rata-rata 64% pada monyet ekor panjang (FERADIS *et al.*, 2001), dan rata-rata 57,6% pada rusa merah (SOLER *et al.*, 2003).

Tabel 2. Karakteristik spermatozoa segar asal *cauda* epididimis domba

Peubah kualitas spermatozoa	Rata-rata
Konsentrasi spermatozoa (juta sel ml^{-1})	11.660 \pm 90,38
Persentase spermatozoa motil (%)	65,00 \pm 0,00
Persentase spermatozoa hidup (%)	81,00 \pm 1,26
Persentase spermatozoa abnormal (%)	7,60 \pm 1,02
Persentase butiran sitoplasma (%)	10,20 \pm 1,17
Persentase membran plasma utuh (%)	82,20 \pm 1,60

Persentase spermatozoa abnormal, butiran sitoplasma, dan MPU yang diperoleh pada penelitian ini masing-masing rata-rata 7,6% (kisaran 6–9%), 10,2% (kisaran 8–11%), dan 82,2% (kisaran 80–84%) (Tabel 2). Hasil yang diperoleh kurang lebih sama dengan yang dilaporkan RIZAL *et al.* (2004a) bahwa persentase spermatozoa abnormal, butiran sitoplasma dan MPU spermatozoa asal *cauda* epididimis domba Garut secara berurutan adalah rata-rata 10,83; 8,5 dan 81,33%. Pada rusa merah, persentase MPU spermatozoa asal *cauda* epididimis lebih dari 90% (SOLER *et al.*, 2003), sedangkan pada monyet ekor panjang rata-rata 63,5% (FERADIS *et al.*, 2001).

Kualitas spermatozoa setelah perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan plasma semen secara umum dapat memperkecil penurunan kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba selama tiga hari penyimpanan pada suhu 3–5°C (Tabel 3). Keadaan ini menunjukkan bahwa penambahan plasma semen ke dalam spermatozoa asal

cauda epididimis domba kemudian diencerkan dengan pengencer yang tepat dapat memberikan perlindungan optimal terhadap membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama penyimpanan pada suhu 3–5°C (ditandai oleh lebih tingginya nilai persentase MPU pada perlakuan penambahan plasma semen, Tabel 3). Hal ini disebabkan oleh plasma semen mengandung berbagai macam makromolekul seperti glikoprotein yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama proses pengolahan semen, terutama saat penyimpanan pada suhu rendah (GILBERT, 1988; JOHNSON dan EVERITT, 1995; NOLAN dan HAMMERSTEDT, 1997). Menurut SITUMORANG *et al.* (1995) glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis dan disekresikan ke dalam plasma semen bersifat khas, dan peranannya dalam melindungi membran plasma sel spermatozoa tidak dapat sepenuhnya digantikan oleh glikoprotein eksogen yang ditambahkan di dalam pengencer semen. TOELIHERE

(1993) menyatakan bahwa penyimpanan semen pada suhu 3–5°C dapat menyebabkan terjadinya kejutan dingin pada spermatozoa, dan mengakibatkan kematian sel. Selanjutnya dinyatakan bahwa untuk mencegah terjadinya kejutan dingin pada spermatozoa, ke dalam pengencer semen ditambahkan kuning telur yang mengandung fosfatidil kolin (lesitin) sebagai zat pencegah terjadinya kejutan dingin. Perbaikan terhadap membran plasma sel akan berpengaruh positif terhadap peubah kualitas spermatozoa yang lain, seperti motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hal ini karena motilitas (daya gerak) spermatozoa sepenuhnya bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan berlangsung dengan baik apabila membran plasma sel berada dalam keadaan utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Tabel 3. Rata-rata persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU spermatozoa asal *cauda* epididimis domba selama penyimpanan pada suhu 3–5°C

Peubah	Perlakuan	Penyimpanan hari ke-			
		1	2	3	4
Spermatozoa motil (%)	Tris	65,00 ± 0,00 ^a	50,00 ± 3,53 ^a	43,00 ± 2,74 ^b	21,00 ± 2,24 ^a
	PS-Tris	65,00 ± 0,00 ^a	55,00 ± 0,00 ^b	46,00 ± 2,24 ^{bc}	43,00 ± 2,74 ^b
	PS-AM15	65,00 ± 0,00 ^a	54,00 ± 2,24 ^b	39,00 ± 2,24 ^a	20,00 ± 0,00 ^a
	PS-AM20	65,00 ± 0,00 ^a	58,75 ± 2,50 ^c	46,25 ± 2,50 ^{bc}	40,50 ± 2,89 ^b
	PS-AM25	65,00 ± 0,00 ^a	57,00 ± 2,74 ^{bc}	47,00 ± 2,74 ^c	40,00 ± 6,12 ^b
Spermatozoa hidup (%)	Tris	75,80 ± 0,84 ^a	61,80 ± 3,70 ^a	50,00 ± 1,58 ^a	34,80 ± 3,49 ^a
	PS-Tris	76,40 ± 0,89 ^a	65,00 ± 2,34 ^{ab}	57,80 ± 1,64 ^{bc}	53,00 ± 1,87 ^c
	PS-AM15	77,20 ± 2,05 ^{ab}	65,00 ± 3,39 ^{ab}	49,00 ± 2,91 ^a	40,00 ± 3,39 ^b
	PS-AM20	76,40 ± 1,95 ^a	69,50 ± 3,32 ^c	55,75 ± 2,36 ^b	53,75 ± 4,03 ^c
	PS-AM25	79,20 ± 2,59 ^b	68,00 ± 2,55 ^{bc}	60,00 ± 3,39 ^c	54,80 ± 4,97 ^c
MPU (%)	Tris	77,00 ± 2,00 ^a	62,00 ± 1,87 ^{ab}	52,60 ± 2,70 ^a	33,60 ± 2,51 ^a
	PS-Tris	76,75 ± 2,06 ^a	62,80 ± 1,64 ^{ab}	57,60 ± 1,52 ^b	53,20 ± 2,28 ^c
	PS-AM15	76,75 ± 2,06 ^a	60,40 ± 1,82 ^a	50,00 ± 2,55 ^a	42,20 ± 6,26 ^b
	PS-AM20	77,80 ± 1,79 ^a	66,50 ± 1,29 ^c	57,00 ± 2,71 ^b	53,75 ± 4,99 ^c
	PS-AM25	78,60 ± 3,13 ^a	64,80 ± 2,39 ^{bc}	57,40 ± 2,70 ^b	55,20 ± 3,90 ^c

^{a,b,c} Superskrip dalam kolom yang sama masing-masing peubah menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Tris = perlakuan pengencer Tris tanpa penambahan plasma semen

PS-Tris = perlakuan plasma semen + pengencer Tris

PS-AM15 = perlakuan plasma semen + pengencer 15% AndroMed

PS-AM20 = perlakuan plasma semen + pengencer 20% AndroMed

PS-AM25 = perlakuan plasma semen + pengencer 25% AndroMed

MPU = membran plasma utuh

GRAHAM (1994) melaporkan persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba setelah *thawing* sebesar 34% untuk spermatozoa yang ditambahkan plasma semen dan hanya 3% untuk spermatozoa yang tidak ditambahkan plasma semen. Selanjutnya dilaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis sapi setelah *thawing* sebesar 66 dan 63% masing-masing untuk yang ditambahkan dan tanpa penambahan plasma semen. Menurut SQUIRES *et al.* (2000) motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis sama dengan spermatozoa hasil ejakulasi jika ditambahkan plasma semen, karena beberapa komponen yang terkandung di dalam plasma semen dapat menstimulasi motilitas spermatozoa. Selanjutnya dilaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis kuda setelah *thawing* rata-rata 12% untuk yang ditambahkan plasma semen dan rata-rata 5% untuk yang tidak ditambahkan plasma semen. Hal sama dilaporkan RIZAL *et al.* (2000) bahwa kualitas semen beku kerbau lumpur dapat ditingkatkan melalui penggantian plasma semen kerbau lumpur dengan plasma semen sapi *Frisian Holstein* (FH) sebelum semen diencerkan. Dilaporkan bahwa kandungan protein dan asam askorbat plasma semen sapi FH lebih tinggi dibandingkan dengan plasma semen kerbau lumpur. Kedua zat tersebut berfungsi mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pengolahan semen.

Di dalam pengencer Tris yang mengandung kuning telur terdapat lipoprotein berupa fosfatidil kolin (lesitin), yang menjadi target utama pemanfaatan kuning telur sebagai salah satu bahan penyusun pengencer semen dalam proses preservasi dan kriopreservasi semen. Lesitin kuning telur ini berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin selama proses preservasi semen. Sumber lesitin di dalam pengencer semen komersial AndroMed berasal dari ekstrak kacang kedelai, yang juga dapat menjalankan fungsi seperti pada lesitin kuning telur. Hasil penelitian AKU (2005) melaporkan bahwa di samping lesitin, AndroMed juga mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak dan gliserilfosforil kolin (GPC). Selanjutnya dilaporkan bahwa AndroMed mengandung lesitin yang cukup tinggi, yakni sebanyak 6,76 g 100 ml⁻¹ (6,76%). Seluruh bahan-bahan yang terkandung di dalam pengencer semen komersial AndroMed tersebut merupakan bahan-bahan yang telah umum digunakan dalam menyusun pengencer semen selama ini. Menurut TOELIHERE (1993) dalam proses preservasi dan kriopreservasi semen, pengencer semen harus mengandung sumber energi (karbohidrat, terutama monosakarida), mineral, protein, zat penyangga (*buffer*), zat pencegah kejutan dingin (lipoprotein

khususnya lesitin), krioprotektan (gliserol dan juga berbagai jenis gula), dan antibiotik, serta tidak toksik terhadap spermatozoa.

Standar Nasional Indonesia (SNI) mensyaratkan bahwa semen yang layak dimanfaatkan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%. Berdasarkan pada standar tersebut, dengan penambahan plasma semen, persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba dapat dipertahankan pada angka minimum 40% hingga hari keempat penyimpanan pada suhu 3–5°C, sehingga masih memenuhi syarat digunakan dalam program IB dan PEIV. Persentase spermatozoa motil pada hari keempat penyimpanan perlakuan PS-Tris (43%), PS-AM20 (40,5%) dan PS-AM25 (40%) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan plasma semen (Tris) yang hanya rata-rata 21%.

Persentase spermatozoa motil perlakuan PS-AM15 pada hari keempat penyimpanan hanya rata-rata 20%, sehingga tidak memenuhi syarat digunakan dalam program IB dan PEIV, walaupun ditambahkan plasma semen sebelum diencerkan. Kualitas spermatozoa yang rendah pada perlakuan PS-AM15 diduga karena pengencer tersebut yang disusun oleh hanya 15% AndroMed memiliki kandungan komponen-komponen yang berfungsi melindungi integritas membran plasma sel dari pengaruh kejutan dingin seperti lesitin dan protein lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan PS-AM20, PS-AM25, dan PS-Tris (mengandung 20% kuning telur). Dengan demikian kemampuan pengencer tersebut dalam memproteksi spermatozoa selama preservasi semen kurang memadai.

Persentase spermatozoa motil yang diperoleh pada penelitian ini mendukung hasil penelitian yang dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya. RIZAL *et al.* (2004b) melaporkan persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba pada hari keempat penyimpanan pada suhu 5°C rata-rata 36,25%. SQUIRES *et al.* (2000) melaporkan persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis kuda setelah didinginkan pada suhu 5°C dan disimpan selama tiga jam adalah rata-rata 44% untuk yang ditambahkan plasma semen dan rata-rata 20% untuk yang tidak ditambahkan plasma semen. Sementara itu, LUBBE *et al.* (1999) melaporkan persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis badak yang telah diencerkan tanpa penambahan plasma semen adalah rata-rata 55, 44 dan 35% setelah masing-masing disimpan selama 6, 12, dan 18 jam pada suhu 4°C.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan plasma semen ke dalam spermatozoa asal *cauda* epididimis domba sebelum diencerkan dengan pengencer Tris atau 20 dan 25%

AndroMed dapat mempertahankan kualitas spermatozoa selama semen disimpan tiga hari pada suhu 3–5°C, sehingga tetap memenuhi syarat digunakan dalam program IB dan PEIV. Pengencer Tris dan pengencer komersial AndroMed dalam konsentrasi tepat (20 dan 25%) memiliki kemampuan relatif sama dalam mempertahankan kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba yang disimpan pada suhu 3–5°C.

DAFTAR PUSTAKA

- AKU, A.S. 2005. Preservasi dan Kriopreservasi Semen Domba Garut (*Ovis aries*) dalam Berbagai Jenis Pengencer Berbasis Lesitin. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- ANEL, L., F. MARTINEZ, M. ALVAREZ, E. ANEL, J.C. BOIXO, M. KAABI, P. PAZ, C. CHAMORRO and P. HERRAEZ. 1999. Post-mortem spermatozoa recovery and freezing in a cantabric brown bear (*Ursus arctos*): A preliminary report. *Theriogenology* 51: 277. Abstract.
- AXNER, E., C.L. FORSBERG and S. EINARSSON. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different region of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 51: 767-777.
- BOUSSEAU, S., J.P. BRILLARD, B. MARGUANT-LE GUIENNE, B. GUERIN, A. CAMUS and M. LECHAT. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 50: 699-706.
- BRAVO, P.W., V. ALARCON and R.H. BONDURANT. 2000. Epididymal spermatozoa characteristics and its use on artificial insemination of llamas and alpacas. Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. pp. 15-18.
- FERADIS, D. PAWITRI, I.K. SUATHA, M. RIZAL AMIN, T.L. YUSUF, D. SAJUTHI, I.N. BUDIARSA and E.S. HAYES. 2001. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 30: 100-106.
- FRONING, G.W. 1998. Recent advances in egg products research and development. Presented at the University of California Egg Processing Workshop. Riverside and Modesto, 2-3 June 1998.
- GILBERT, S.F. 1988. *Developmental Biology* 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc Publisher, Massachusetts.
- GRAHAM, J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 46: 1151-1162.
- HAFEZ, E.S.E. and B. HAFEZ. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- JOHNSON, M.H. and B.J. EVERITT. 1995. *Essential Reproduction*. 4th Edition. Blackwell Science, Oxford.
- LUBBE, K., R.L. SMITH, P. BARTELS and R.A. GODKE. 1999. Freezing epididymal sperm from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) treated with different cryodiluents. *Theriogenology* 51: 288. Abstract.
- NOLAN, J.P. and R.H. HAMMERSTEDT. 1997. Regulation of membrane stability and acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* 11: 670-682.
- REVELL, S.G. and R.A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- RIZAL, M. 2004. Penyimpanan epididimis domba pada suhu 5°C selama tiga hari: Pengaruhnya terhadap kualitas spermatozoa yang telah dibekukan. *Media Kedokteran Hewan* 20: 57-61.
- RIZAL, M. 2006. Fertilitas semen beku hasil ejakulasi dan spermatozoa beku asal *cauda* epididimis domba Garut. *J. Sain Veteriner* 24: 49-57.
- RIZAL, M., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan P. SITUMORANG. 2004a. Pengaruh waktu penyimpanan epididimis pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa epididimis domba garut. *J. Vet.* 5: 95-103.
- RIZAL, M., HERDIS dan A. BOEDIONO. 2004b. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). *Anim. Prod.* 6: 30-36.
- RIZAL AMIN, M., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, P. SITUMORANG and B. PURWANTARA. 2000. Effect of bovine seminal plasma substitution and various extenders on the quality of swamp buffalo frozen semen. Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. pp. 16.
- SANKAI, T., K. TERAOKA, R. YANAGIMACHI, F. CHO and Y. YOSHIKAWA. 1994. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 101: 273-278.
- SENGER, P.L. 1999. The organization and function of the male reproductive system. *In: Pathways to Pregnancy and Parturition*. Current Conceptions, Inc., Pullman. pp. 51.
- SITUMORANG, P., E. TRIWULANNINGSIH, K. DIWYANTO, I.G. PUTU dan A.R. SIREGAR. 1995. Pengaruh plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). *Ilmu dan Peternakan Edisi Khusus*. hlm. 100-108.
- SOLER, A.J., M.D. PEREZ-GUZMAN and J.J. GARDE. 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. *J. Exp. Zool.* 295A: 188-199.
- SQUIRES, E.L., C. GOMEZ-CUETARA and J.K. GRAHAM. 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Proceedings of 14th International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. pp. 38.

- STEEL, R.G.D. dan J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- TOLLNER, T.L., C.A. VAN DE VOORT, J.W. OVERSTREET and E.Z. DROBNIS. 1990. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 90: 347-352.
- TOMES, G.L., D.E. ROBERTSON and LIGHTFOOT. 1979. Sheep Breeding 2nd Edition. Butterworths, London.