

Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer Pasca Pembekuan dalam Pengencer Tris Dasar Soya dengan Kombinasi Gula yang Berbeda

Viability of Boer Goat Spermatozoa Post-Freezing In Basic Soya Tris Diluent Combined with Different Sugar

Loudrian Masfai Putra*, Nur Ducha

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: loudri29@gmail.com

ABSTRAK

Pengencer semen membutuhkan gula sebagai sumber energi maupun sebagai krioprotektan. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan perbedaan pengaruh kombinasi berbagai jenis gula dalam pengencer tris dasar soya terhadap daya hidup (viabilitas) spermatozoa kambing Boer pasca pembekuan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas empat perlakuan yaitu K (tanpa gula), P1 (fruktosa), P2 (fruktosa dan trehalosa) dan P3 (fruktosa dan rafinosa). Pengamatan viabilitas untuk semen yang telah dibekukan (*freezing*) diawali dengan *thawing* terlebih dahulu, lalu dibuat apusan menggunakan pewarnaan eosin-nigrosin. Apusan tersebut difiksasi menggunakan api dan diamati oleh dua pengamat dengan mikroskop cahaya elektrik dengan perbesaran 400x. Data dianalisis menggunakan uji Anova satu arah dan dilanjutkan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan fruktosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa dalam pengencer tris dasar soya menghasilkan persentase viabilitas *post thawing* terbaik dengan nilai $40,42 \pm 0,44$ dan $41,77 \pm 0,32$. Simpulan penelitian ini adalah kombinasi jenis gula yang berbeda dalam pengencer tris dasar soya memberikan pengaruh yang berbeda terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer pasca pembekuan. Kombinasi gula terbaik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa pasca pembekuan adalah fruktosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa.

Kata kunci: fruktosa; trehalosa; rafinosa; pengencer tris dasar soya; viabilitas spermatozoa kambing Boer.

ABSTRACT

In the semen diluent needs sugar as an energy source and as a cryoprotectant. This study aimed to compare the differences in the effect of a combination of various types of sugars in basic soya tris diluent on the survival (viability) of Boer goat spermatozoa after freezing. This research used completely randomized design (CRD), which consisted of 4 treatment namely K (without sugar), P1 (fructose), P2 (fructose and trehalose) and P3 (fructose and raffinose). Observations viability to semen that has been frozed (freezing) begins with thawing first, then made a smear use eosin-nigrosin staining. The smears were fixed with flame and observed by two observers use electric light microscope with a magnification of 400x. Data were analyzed using one-way ANOVA test and followed by Duncan test. The results showed that the fructose treatment and the combination of fructose and raffinose in basic soya tris diluent on the percentage of post thawing viability were best with a value of 40.42 ± 0.44 and 41.77 ± 0.32 . It can be concluded that the combination of different types of sugars basic soya tris diluent have different effects on the viability of Boer goats spermatozoa after freezing. The fructose treatment and combination of fructose and raffinose in basic soya tris diluent were the best to maintain the viability of spermatozoa after freezing compared with other treatments.

Key words: fructose; trehalose; raffinose; soya-based tris diluent; viability of Boer goat spermatozoa.

PENDAHULUAN

Salah satu kambing unggulan yang sering dipilih oleh peternak dalam usaha mengembangkan kambing adalah kambing Boer. Kambing Boer (*Capra aegagrus hircus*) merupakan kambing tipe pedaging yang sangat baik karena memiliki bobot lahir 3-4 kg dan laju pertambahan berat badan harian sekitar 140-250 gr/hari/ekor (Pamungkas dkk., 2008). Karena keunggulannya tersebut kambing Boer berpotensi untuk memenuhi kebutuhan daging di Indonesia. Upaya untuk meningkatkan populasi ternak, dalam hal ini adalah kambing Boer yaitu dengan menerapkan

teknologi Inseminasi Buatan (IB) (Rizal dan Herdiz, 2008). Guna menunjang program IB perlu adanya stok semen yang cukup dan berkualitas baik. Adanya program IB tidak akan lepas dari teknik penyimpanan semen baik dalam bentuk penyimpanan cair maupun penyimpanan beku. Pada umumnya program IB dilakukan dengan menggunakan semen beku (Umami dkk., 2015). Masalah pada proses pembekuan semen umumnya adalah fenomena *cold shock* terhadap sel spermatozoa dan perubahan-perubahan intraseluler yaitu pembentukan kristal-kristal es. Hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya

kerusakan pada membran plasma dan tudung akrosom (Ismaya, 2014), sehingga dapat menurunkan daya hidup spermatozoa.

Daya hidup atau viabilitas spermatozoa diamati dengan teknik pewarnaan diferensial menggunakan pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan kondisi kepala spermatozoa yang transparan, sedangkan spermatozoa yang mati ditandai dengan kepala spermatozoa yang berwarna merah atau merah muda karena telah menyerap pewarna di sekelilingnya dikarenakan membran spermatozoa telah rusak sehingga merusak permeabilitasnya (Isnaeni, 2011). Menurut penelitian Ihsan (2013) dalam parameter viabilitasnya, selain kerusakan membran ketersediaan energi juga sangat berpengaruh terhadap tingkat kematian sel spermatozoa. Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi persoalan tersebut adalah dengan menambahkan pengencer yang di dalamnya terdapat komponen gula yang dapat berperan sumber energi dan krioprotektan. Karbohidrat seperti fruktosa dapat berfungsi sebagai sumber energi, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Souhoka *et al.*, 2009).

Untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama semen disimpan, baik pada suhu refrigerator maupun suhu beku maka dibutuhkanlah pengencer (Ducha dkk., 2013). Salah satu pengencer yang dapat digunakan pada proses penyimpanan semen kambing yaitu pengencer tris yang terbukti dapat mempertahankan semen sapi dan kambing dalam refrigerator pada suhu 3-5°C (Rizal dan Herdis, 2008). Modifikasi yang umumnya dilakukan pada penelitian pengencer tris adalah modifikasi jenis atau konsentrasi gula. Belum ada penelitian sebelumnya yang memodifikasi kombinasi gula pada pengencer tris berbasis soya pada semen kambing Boer. Rizal dkk., (2006) memaparkan bahwa penambahan dextrosa, rafinosa, trehalosa, dan sukrosa di dalam pengencer tris dasar dengan suplementasi kuning telur efektif meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian Isnaeni (2011) menunjukkan bahwa berbagai level trehalosa pada pengencer tris dasar kuning telur berpengaruh baik terhadap viabilitas spermatozoa, baik setelah pendinginan maupun pembekuan.

Berdasarkan uraian di atas, untuk mendapat kombinasi gula yang sesuai dalam pengencer tris dasar soya maka dilakukanlah penelitian yang bertujuan untuk membandingkan pengaruh kombinasi gula yang berbeda dalam pengencer tris

dasar soya terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer pascapembekuan.

BAHAN DAN METODE

Preparasi Pengencer, Pembuatan pengencer dibutuhkan: 2,40 g Tris (*hidroxymethyl aminomethan* (Bio World Tris-Base), 2 g fruktosa (Sigma USA), 1,30 g asam sitrat monohidrat (EMSURE), 100.000 IU penisilin-G (Meiji, Japan), 0,1 g streptomisin sulfat (Meiji, Japan), aquades steril (Milli-Q-water 100 ml) dan bubuk soya (Melilea). Pengencer Tris tersebut kemudian ditambahkan kombinasi gula yang berbeda yakni 0,4 g rafinosa dan 0,4 g trehalosa serta ditambahkan gliserol 6% untuk pengenceran B. Bahan untuk pembuatan pengencer perlakuan kontrol yaitu pengencer tris dasar soya tanpa kombinasi gula.

Preparasi Semen, Semen segar yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil penampungan kambing peranakan Boer yang ada di Laboratorium Lapang *Teaching Farm* Airlangga, Gresik yang berumur dua tahun. Sebelum dilakukan pengenceran, semen segar pemeriksaan secara mikroskopis dan makroskopis. Pemeriksaan dilakukan untuk mengetahui kelayakan semen untuk diproses lebih lanjut dengan dibekukan dan untuk mengetahui adanya perubahan setelah penyimpanan.

Pengamatan Viabilitas Spermatozoa, Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan dengan membuat apusan menggunakan pewarnaan eosin-nigrosin. Untuk semen yang telah dibekukan (*freezing*), terlebih dahulu dilakukan proses *thawing* di dalam *water bath* pada suhu 32°C selama 30 detik. Semen yang sudah diletakkan pada *object glass* ditetesi pewarna eosin-nigrosin, kemudian dicampurkan dan dibuat apusan. Pembuatan apusan dilakukan dengan cara menempelkan ujung *object glass* yang lain pada semen dan pewarna yang sudah tercampur kemudian ditarik dari satu ujung ke ujung lain sehingga didapatkan olesan tipis sepanjang *object glass*. Setelah itu difiksasi menggunakan api dan diamati oleh dua orang pengamat dengan mikroskop cahaya elektrik dengan perbesaran 400x.

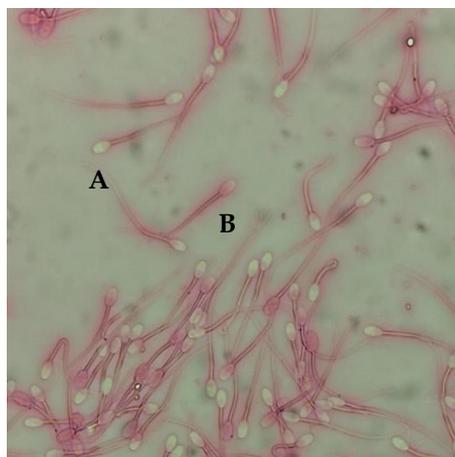
Analisis Data, Data viabilitas yang berupa persentase ditransformasikan terlebih dahulu ke dalam *arc sin* atau logaritma setelah itu dianalisis secara statistik dengan melihat distribusi datanya. Selanjutnya data diuji dengan statistik parametrik dengan metode ANAVA Satu Arah dan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda *Duncan* pada taraf uji 5%. Perhitungan statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS 17.0 *for windows*.

HASIL

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan pewarna eosin nigrosin. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan tidak menyerap warna, sedangkan spermatozoa yang mati dan ditandai dengan penyerapan warna (Gambar 1). Rata-rata persentase viabilitas *before freezing* dan *post thawing* spermatozoa kambing peranakan Boer menunjukkan pada perlakuan fruktosa serta kombinasi fruktosa dan rafinosa relatif lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol serta kombinasi fruktosa dan trehalosa. Hasil uji Duncan menunjukkan persentase viabilitas *before freezing*

pada kombinasi fruktosa, fruktosa dan trehalosa, serta fruktosa dan rafinosa tidak memiliki perbedaan yang nyata. Hasil uji Duncan pada persentase motilitas *post thawing* menunjukkan terdapat perbedaan nyata pada setiap perlakuan dalam penelitian, tetapi pada perlakuan fruktosa dan kombinasi fruktosa dan rafinosa tidak memiliki perbedaan yang nyata (Tabel 1).

Persentase viabilitas spermatozoa kambing Boer *before freezing* dan *post thawing* pada pengencer tris berbasis soya dengan berbagai kombinasi gula menunjukkan perbandingan yang berbeda. Persentase viabilitas spermatozoa kambing Boer *before freezing* lebih tinggi dibandingkan dengan *post thawing* (Gambar 2).

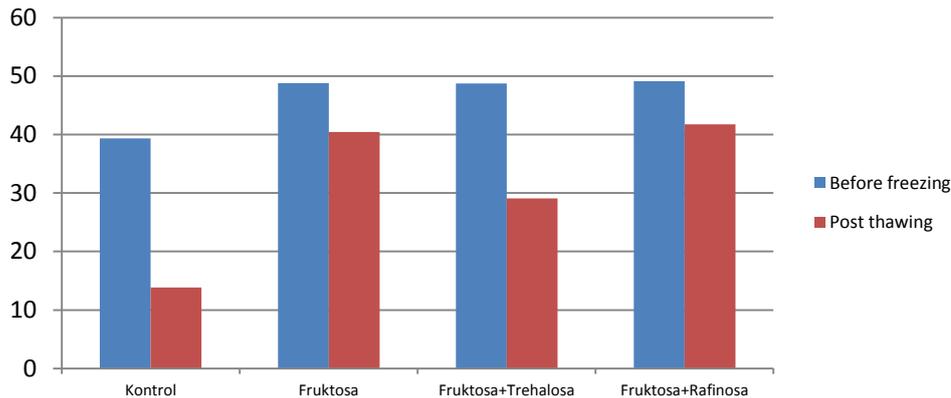


Gambar 1. Gambaran spermatozoa peranakan kambing Boer yang hidup dan mati dengan menggunakan mikroskop cahaya elektrik dengan perbesaran 400x. Keterangan: (A) spermatozoa hidup, (B) spermatozoa mati.

Tabel 1. Hasil uji Duncan, rata-rata persentase dan standart deviasi dari viabilitas spermatozoa kambing peranakan Boer dengan berbagai kombinasi gula dalam pengencer tris berbasis soya (%).

Kombinasi Gula	Tahapan Pengamatan	
	<i>Before Freezing</i>	<i>Post Thawing</i>
Kontrol	39,33±1,36 ^a	13,83±1,94 ^a
Fruktosa	48,82±0,72 ^b	40,42±0,44 ^c
Fruktosa dan Trehalosa	48,72±0,217 ^b	29,07±1,02 ^b
Fruktosa dan Rafinosa	49,12±0,41 ^b	41,77±0,32 ^c

Keterangan: Notasi yang berbeda (a, b, c, d) menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) berdasarkan uji Duncan.



Gambar 2. Grafik persentase viabilitas spermatozoa kambing peranakan Boer dalam pengencer tris berbasis soya dengan konsentrasi fruktosa yang berbeda.

PEMBAHASAN

Viabilitas merupakan pengamatan terhadap spermatozoa yang hidup dan mati dilakukan dengan menggunakan metode pewarnaan eosin nigrosin. Sel-sel spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna sedang sel-sel yang mati akan menyerap warna karena penurunan permeabilitas membran sel, sehingga senyawa kimia dapat dengan bebas melewati membran plasma dan masuk ke dalam sel spermatozoa (Ducha, 2012).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi berbagai jenis gula dalam pengencer tris berbasis soya mempengaruhi viabilitas spermatozoa *before freezing*. Hal tersebut terlihat pada kelompok perlakuan kontrol dengan rerata viabilitas sebesar $39,33 \pm 1,36$. Nilai ini lebih kecil dibandingkan kelompok perlakuan fruktosa, kombinasi fruktosa dan trehalosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa. Kombinasi gula yang berbeda juga mempengaruhi nilai viabilitas *post thawing* pada perlakuan kontrol, fruktosa, kombinasi fruktosa dan trehalosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa.

Rendahnya persentase hidup spermatozoa pada perlakuan kontrol dikarenakan pada konsentrasi tersebut belum mampu mencukupi kebutuhan energi spermatozoa dan tidak adanya krioprotektan yang optimal. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Fernandez-santos *et. al.*, (2007), bahwa pada konsentrasi gula 0 g dalam tris kuning telur persentase hidup spermatozoa yang dihasilkan rendah yaitu $12,50 \pm 3,97$. Penelitian Ariantie dkk., (2014) juga menunjukkan penambahan trehalose dan rafinose memiliki pengaruh paling baik dalam menjaga viabilitas semen kambing PE selama pembekuan.

Hasil uji Duncan ($\alpha = 0,05$) pada viabilitas *before freezing* menunjukkan kelompok perlakuan kontrol memiliki notasi yang berbeda dengan

kelompok perlakuan fruktosa, kombinasi fruktosa dan trehalosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa, tetapi pada perlakuan fruktosa, kombinasi fruktosa dan trehalosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa tidak terdapat perbedaan yang nyata. Pada viabilitas *post thawing* menunjukkan kelompok perlakuan kontrol memiliki perbedaan yang nyata dengan kelompok perlakuan fruktosa, kombinasi fruktosa dan trehalosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa, tetapi pada perlakuan fruktosa serta kombinasi fruktosa dan rafinosa tidak terdapat perbedaan yang nyata. Dari hasil diatas menunjukkan bahwa kombinasi gula terbaik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa kambing peranakan Boer pasca pembekuan adalah pada perlakuan fruktosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa. Rendahnya persentase hidup spermatozoa pada perlakuan kontrol dikarenakan pada konsentrasi tersebut belum mampu mencukupi kebutuhan energi spermatozoa dan mulai rusaknya membran plasma spermatozoa. Selain karena adanya fruktosa sebagai sumber energi, rafinosa juga berfungsi menstabilkan kualitas spermatozoa terhadap pengaruh buruk penyimpanan dan pembekuan dalam nitrogen (N_2) cair (Fernández-Santos *et al.*, 2007). Rafinosa merupakan oligosakarida dari satu molekul galaktosa dan glukosa yang terikat, serta satu molekul fruktosa yang berperan dalam menjaga stabilitas membran plasma karena dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Ariantie, 2013).

Dalam parameter viabilitas, Ihsan (2013) menjelaskan bahwa selain kerusakan membran, ketersediaan energi juga sangat berpengaruh terhadap tingkat kematian sel spermatozoa. Menurut Hardijanto dkk., (2009) adanya sumber energi dalam pengencer dapat meminimalisir kematian spermatozoa. Adanya ketersediaan

sumber energi memungkinkan mitokondria melakukan serangkaian metabolisme sehingga suplai kebutuhan ATP untuk kelangsungan hidup spermatozoa terpenuhi (Rusiyantono, 2008). Hasil penelitian terhadap nilai viabilitas menunjukkan bahwa persentase spermatozoa hidup pada tahap pengamatan *before freezing* lebih tinggi daripada persentase spermatozoa hidup pada tahap pengamatan *post thawing*.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kombinasi jenis gula yang berbeda dalam pengencer tris dasar soya memberikan pengaruh yang berbeda terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer pasca pembekuan. Kombinasi gula terbaik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa pasca pembekuan adalah pada perlakuan fruktosa, serta kombinasi fruktosa dan rafinosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariantie OS, 2013. Kriopreservasi Semen Kambing Peranakan Etawah (PE) Menggunakan Pengencer Tris-Kuning Telur dan Tris-Soya dengan Modifikasi Karbohidrat dan Krioprotektan Berbeda. *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor; Bogor.
- Ariantie OS, Yusuf TL, Sajuthi D, Arifiantini RI, 2014. Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Etawah Dalam Modifikasi Pengencer Tris Dengan Trehalose dan Rafinosa. *Jurnal Veteriner*. 15 (1): 11-22. ISSN: 1411 - 8327.
- Ducha N, 2012. Suplementasi Kuning Telur Dalam Pengencer CEP-2 terhadap Kualitas Dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Pada Suhu 4-5°C. *Disertasi*. Malang: Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahyuningsih S, 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7 (1), Maret 2013.
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, García-Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 67 (4): 738-753.
- Hardijanto T, Sardjito T, Hernawati S, Susilowati, Suprayogi TW, 2009. Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ihsan MN, 2013. Pembekuan Vitriifikasi Semen Kambing Boer Dengan Tingkat Gliserol Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 14 (2): 38-45.
- Ismaya, 2014. Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau. Gajah Mada Press, Yogyakarta.
- Isnaeni N, 2011. Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer Pasca Pendinginan dan Pembekuan Menggunakan Pengencer Dasar Tris Dengan Level Trehalose yang Berbeda. *J. Ternak Tropika*. 12, (1): 27-37, 2011.
- Pamungkas FA, Mahmilia F, dan Elieser S, 2008. Perbandingan Karakteristik Semen Kambing Boer dengan Kacang. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2008*.
- Rizal M, dan Herdis, 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Jakarta: Rineka Cipta.
- Rizal M, Herdis, Boediono A, Aku AS dan Yulnawati, 2006. *Role of various sugars in improving frozen semen quality of Garut ram*. *JITV* 11(2): 123-130.
- Rusiyantono Y, 2008. Penambahan Krioprotektan Dalam Bahan Pengencer Untuk Pembuatan Semen Beku Melalui Teknologi Sederhana Dalam Menunjang Pelaksanaan IB Daerah. *Seminar Nasional Sapi Potong*.
- Souhoka DF, Matatula MJ, Mesang-Nalley WM, Rizal M, 2009. Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing Peranakan Etawah yang dipreservasi dengan plasma semen domba Priangan. *J Veteriner*. 10 (3): 135-142.
- Umami PLM, Bintara R, Ismaya, 2015. Pengaruh Aras Kuning Telur Itik Alabio (*Anas platyrhynchos*) dalam Pengencer Tris Fruktosa terhadap Motilitas, Viabilitas, dan Abnormalitas Sperma Kambing Bligon Sebelum dan Sesudah Kriopreservasi. *Buletin Peternakan*. 39 (3): 142-148, Oktober 2015.