

Motilitas Spermatozoa Sapi Brahman dengan Berbagai Konsentrasi dalam Pengencer CEP-D yang Disimpan dalam Refrigerator

The Motility of Brahman Bull Sperm With Various of Concentration in CEP-D Diluents Stored in Refrigerator

Mohamad Muslih Fiqri*, Nur Ducha, Raharjo

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: mmuslihfiqri@yahoo.co.id

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi spermatozoa terbaik dan mendiskripsikan pengaruh konsentrasi spermatozoa yang mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Brahman selama penyimpanan dalam *refrigerator* dengan temperatur 4-5°C. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan yang digunakan adalah 15 x 10⁶/ml, 20 x 10⁶/ml, 25 x 10⁶/ml, 30 x 10⁶/ml, dan semen segar sebagai kontrol dengan konsentrasi spermatozoa tinggi (1660 x 10⁶/ml). Motilitas spermatozoa diamati setiap hari dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 200X pada suhu 37°C hingga mencapai penurunan motilitas 40%. Data motilitas dianalisis menggunakan anava satu arah. Hasil penelitian motilitas spermatozoa mampu bertahan selama 7 hari penyimpanan dengan persentase motilitas setiap perlakuan didapatkan 15 x 10⁶/ml (42,50%), 20 x 10⁶/ml (39,38%), 25 x 10⁶/ml (39,38%), 30 x 10⁶/ml (35,63%), dan semen segar (0,00%). Analisis data menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa selama penyimpanan dalam pengencer CEP-D berpengaruh nyata terhadap motilitas spermatozoa sapi Brahman selama penyimpanan pada *refrigerator* dengan konsentrasi spermatozoa terbaik selama penyimpanan adalah 15 x 10⁶/ml.

Kata kunci: konsentrasi spermatozoa; sapi brahman; pengencer CEP-D; motilitas

ABSTRACT

The aims of this research were to obtain the best spermatozoa concentration and describe the effect of spermatozoa concentration that could maintain the motility of Brahman bull spermatozoa during storage in refrigerator with temperature of 4-5°C. This research used completely randomized design with 5 treatments and 4 replications. The factors in this research were 15 x 10⁶/ml, 20 x 10⁶/ml, 25 x 10⁶/ml, 30 x 10⁶/ml and fresh semen as control factor with spermatozoa high concentration (1660 x 10⁶/ml). Sperm motility was observed using light microscope 200X magnification at temperature of 37°C. The results of motility observations were analyzed by using one way anaova. The result showed that survive sperm during 7 days storage have percentage of motility factor were 15 x 10⁶/ml (42.50%), 20 x 10⁶/ml (39.38%), 25 x 10⁶/ml (39.38%), 30 x 10⁶/ml (35.63%), and fresh semen (0.00%). The data showed that the concentrations of spermatozoa during storage in CEP-D diluents significantly influence to the motility of Brahman bull spermatozoa during storage in refrigerator and the best spermatozoa concentration during storage was 15x10⁶/ml.

Key words: spermatozoa concentration; brahman bull spermatozoa; CEP-D diluents; motility

PENDAHULUAN

Penyimpanan spermatozoa dengan metode pembekuan (dalam bentuk semen beku) membutuhkan biaya yang cukup mahal dalam produksinya dan juga memiliki kendala keterbatasan penyediaan nitrogen cair ketika akan didistribusikan pada tempat yang sulit terjangkau. Oleh karena itu, penyimpanan pada temperatur di atas titik beku pada *refrigerator* dapat dijadikan sebagai alternatif di dalam Inseminasi Buatan (IB) karena proses penyimpanan lebih mudah, tidak membutuhkan

nitrogen cair serta biaya yang digunakan relatif lebih murah dibandingkan dengan penyimpanan pada nitrogen cair (Toelihere, 1981).

Penyimpanan spermatozoa memerlukan media pengencer untuk memberikan tambahan nutrisi serta memberikan kondisi yang sesuai (Garner and Hafez, 2000). Pengencer CEP-D adalah media pengencer spermatozoa yang mengandung beberapa mineral, sumber energi, pH dan memiliki osmolaritas yang sama dengan keadaan plasma kauda epididimis dengan komposisi yang diadaptasi dari Verberckmoes

et.al. (2004) dan dimodifikasi oleh Ducha (2012) dengan mengubah antibiotik *gentamycin-s* dengan antibiotik penisilin dan streptomisin, menghilangkan kalium nitrat dan natrium nitrat, serta penggunaan membran milipore untuk sterilisasi.

Pada media pengencer spermatozoa terdapat nutrisi yang dijadikan sebagai sumber energi metabolisme spermatozoa selama penyimpanan (Hardijanto, 2010). Menurut Wahjuningsih *et.al.* (2012) selama penyimpanan jumlah spermatozoa yang banyak akan menyebabkan persaingan dalam menggunakan nutrisi, sementara ketersediaan nutrisinya terbatas.

Motilitas (pergerakan) spermatozoa terjadi karena adanya selubung mitokondria pada bagian tengah ekor spermatozoa yang berperan sebagai tempat sintesis energi untuk pergerakan (Feradis, 2010). Pergerakan ekor spermatozoa bergantung pada produksi ATP oleh mitokondria dengan sumber energi metabolisme berasal dari fruktosa yang terkandung dalam pengencer (Sonjaya, 2012). Pada suhu rendah metabolisme spermatozoa akan berjalan berlangsung secara perlahan sehingga dapat menghemat penggunaan sumber energi (Susilawati, 2011; Vishwanath and Shannon, 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi spermatozoa terbaik dan mendeskripsikan pengaruh konsentrasi spermatozoa yang mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Brahman selama penyimpanan dalam *refrigerator* dengan temperatur 4-5°C.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Juni-Juli 2014 di laboratorium Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan lima perlakuan dan empat ulangan.

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain: Bahan kimia pengencer CEP-D terdiri dari 15 mmol NaCl, 7.0 mmol KCl, 3.0 mmol CaCl₂ (H₂O)₂, 3.0 mmol MgCl₂ (H₂O)₆, 11.9 mmol NaHCO₃, 8.0 mmol NaH₂PO₄, 20.0 mmol KH₂PO₄, 55 mmol fruktosa, 1.0 g sorbitol, 2.0 g BSA, 133.7 mmol Tris, 1000 IUI *penicillin*; 1 gram *streptomycin*, 42.6 mmol asam sitrat. Bahan untuk suplementasi kuning telur yaitu kuning telur dari telur peternak yang biasa digunakan di BBIB Singosari. Bahan yang digunakan untuk pengenceran berupa semen segar sapi Brahman dengan motilitas individu $\geq 50\%$ dan motilitas massa minimal 2+. Pengenceran semen segar dilakukan pada *waterbath* dengan perlakuan konsentrasi spermatozoa dalam media pengencer CEP-D +

kuning telur 20% (CEP-D+KT20%) yaitu 15 x 10⁶/ml, 20 x 10⁶/ml, 25 x 10⁶/ml, dan 30 x 10⁶/ml serta semen segar (1660 x 10⁶/ml) sebagai perlakuan kontrol.

Pengamatan motilitas dilakukan di atas *slide warmer* suhu 37°C. Dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 200X. Penilaian motilitas spermatozoa dengan cara membandingkan antara spermatozoa yang bergerak progresif ke depan dan spermatozoa yang bergerak berputar di tempat (Garner and Hafez, 2000). Pengamatan motilitas spermatozoa diamati hingga motilitas mencapai penurunan 40%.

Data motilitas dalam persentase ditransformasi arcsin (Yitnosumarto, 1993), kemudian diuji normalitas dan selanjutnya dianalisis dengan anava satu arah serta dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan's untuk mengetahui perbedaan antarperlakuan.

HASIL

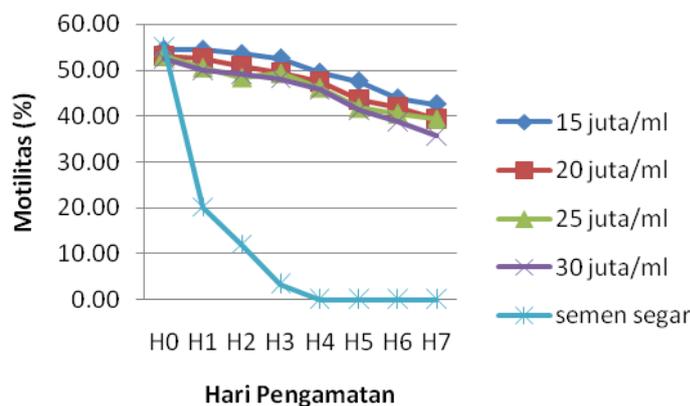
Pengamatan motilitas spermatozoa sapi Brahman dilakukan setiap hari, sehingga dapat diketahui perubahan yang terjadi pada setiap perlakuan. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman dengan konsentrasi spermatozoa yang berbeda mengalami penurunan pada setiap harinya. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman mulai dari konsentrasi spermatozoa terbesar sampai terkecil pada penyimpanan hari ke-7 masing-masing perlakuan adalah semen segar (0,00%±0,00), 30 x 10⁶/ml (35,63%±0,74), 25 x 10⁶/m (39,38%±1,40), 20 x 10⁶/ml (39,39%±0,73), dan 15 x 10⁶/ml (42,50%±0,18). Kelompok perlakuan konsentrasi 15 x 10⁶/ml berbeda nyata (P<0,05) dengan perlakuan yang lainnya. Rata-rata persentase motilitas perlakuan dengan konsentrasi spermatozoa lebih sedikit memberikan hasil terbaik daripada perlakuan yang lainnya. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 1.

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman mengalami penurunan dari pengamatan hari ke-0 sampai hari ke-7. Grafik pada Gambar 1 memperlihatkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa menunjukkan semakin tinggi konsentrasi spermatozoa, semakin cepat penurunan motilitasnya. Hal tersebut tampak dari hasil grafik penurunan motilitas. Perlakuan dengan konsentrasi spermatozoa 15 x 10⁶/ml, 20 x 10⁶/ml, 25 x 10⁶/ml, dan 30 x 10⁶/ml dari hari ke-0 sampai hari ke-7 menunjukkan posisi grafik yang semakin menurun.

Tabel 1. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman dengan konsentrasi spermatozoa yang berbeda dalam pengencer CEP-D+KT20% selama penyimpanan pada temperatur 4-5°C

Konsentrasi spermatozoa (10 ⁶ /ml)	Rata-rata motilitas selama hari penyimpanan (%) ± simpangan baku							
	H0	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
15 juta/ml	54,38 ^a ±0,72	54,38 ^b ±0,72	53,44 ^b ±0,90	52,50 ^b ±1,17	49,38 ^c ±0,71	47,50 ^d ±0,00	43,75 ^d ±0,83	42,50 ^d ±1,18
20 juta/ml	53,13 ^a ±0,72	52,50 ^b ±1,17	50,94 ^b ±0,90	49,38 ^b ±0,71	47,50 ^{bc} ±1,17	43,57 ^c ±0,83	41,88 ^c ±0,73	39,38 ^c ±0,73
25 juta/ml	53,13 ^a ±1,37	50,63 ^b ±1,36	48,44 ^b ±0,90	49,38 ^b ±1,36	46,25 ^b ±0,83	41,88 ^b ±0,73	40,63 ^c ±0,73	39,38 ^c ±1,40
30 juta/ml	52,50 ^a ±1,17	50,00 ^b ±1,65	49,06 ^b ±1,58	48,13 ^b ±1,80	45,63 ^b ±0,72	41,25 ^b ±0,84	38,75 ^b ±0,84	35,63 ^b ±0,74
semen segar	55,00 ^a ±0,00	20,06 ^a ±5,77	12,00 ^a ±5,11	3,40 ^a ±6,10	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00	0,00 ^a ±0,00

Keterangan : notasi yang berbeda (a,b,c,d) pada kolom yang sama menunjukkan bahwa perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata (P<0.05) terhadap motilitas spermatozoa. H0=hari ke-0, H2=hari ke-2 dst, n=7



Gambar 1. Grafik perubahan rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman dengan konsentrasi spermatozoa berbeda yang disimpan pada temperatur 4-5°C. H0=hari ke-0, H2=hari ke-2 dst, n=7

PEMBAHASAN

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dengan konsentrasi spermatozoa berbeda memberikan perbedaan yang nyata (P < 0,05). Perlakuan dengan penambahan pengencer CEP-D+KT20% mampu mempertahankan motilitas selama beberapa hari. Kondisi media pengencer CEP-D+KT20% yang digunakan sesuai dengan kondisi lingkungan hidup spermatozoa. Menurut Ducha (2012) penambahan media pengencer CEP-D yang mengandung sumber energi berupa fruktosa, mineral, pH, dan osmolaritas yang sama dengan keadaan pada plasma kauda epididimis mampu mempertahankan motilitas selama masa penyimpanan.

Motilitas spermatozoa bergantung pada produksi ATP oleh mitokondria pada bagian ekor

spermatozoa yang mensintesis energi untuk pergerakan yang bersumber dari fruktosa yang terkandung dalam media pengencer (Sonjaya, 2012; Feradis, 2010). Akibat dari metabolisme yang terus berlangsung menyebabkan ketersediaan nutrisi akan semakin menipis, sedangkan konsentrasi spermatozoa semen segar sangat tinggi yaitu 1660 juta/ml. Jumlah spermatozoa yang banyak akan mempercepat penggunaan nutrisi untuk keperluan metabolisme spermatozoa, sehingga nutrisi akan cepat habis dan produksi ATP di mitokondria akan terhambat sehingga dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa. Selain adanya kandungan fruktosa dalam media pengencer menurut Feradis (2010) pada kuning telur terdapat glukosa yang dapat berperan sebagai sumber energi tambahan untuk

pergerakan spermatozoa selama masa penyimpanan.

Data yang diperoleh pada hari ke-7 menunjukkan semakin tinggi konsentrasi spermatozoa mempercepat penurunan motilitas. Hal ini sesuai dengan penelitian Wahjuningsih *et.al.*(2012) dan Bhintoro (2012) bahwa banyaknya jumlah spermatozoa akan menyebabkan kompetisi penggunaan nutrisi yang terbatas dalam pengencer sehingga dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Jumlah spermatozoa yang banyak akan mempercepat penumpukan asam laktat yang bersifat toksik sebagai akibat dari hasil akhir metabolisme (Wahjuningsih, *et.al.*, 2012; Samsudewa, dkk., 2007). Asam laktat yang tertimbun akan mengubah kondisi media pengencer menjadi lebih asam, sehingga mempengaruhi motilitas spermatozoa.

Selain asam laktat, metabolisme spermatozoa juga menghasilkan *reactive oxygen species* (ROS) yang berasal dari proses respirasi di mitokondria (Hayati, 2011). Peningkatan konsentrasi spermatozoa menyebabkan ROS akan semakin cepat terbentuk dan kadarnya akan semakin tinggi sebagai akibat banyaknya proses metabolisme spermatozoa. Selama penyimpanan ROS akan semakin menumpuk. Kadar ROS yang tinggi akan mempengaruhi integritas DNA dalam inti spermatozoa dan juga kelenturan membran spermatozoa dengan cara mengoksidasi membran sehingga menurunkan motilitas spermatozoa (Hayati, 2011).

ROS dapat diminimalkan dengan adanya kandungan *low-density lipoproteins* (LDL) pada kuning telur dengan cara asosiasi antara LDL dengan membran spermatozoa dan memberikan perlindungan dengan menstabilkan membran. Selain itu LDL akan membentuk lapisan pelindung pada permukaan spermatozoa dengan mengganti membran fosfolipid yang rusak (Manjunath, 2012).

Pada hari ke-6 dan ke-7 setiap perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata kecuali pada perlakuan penyimpanan dengan konsentrasi 20×10^6 dan 25×10^6 . Pada perlakuan tersebut lama penyimpanan dengan konsentrasi 20×10^6 dan 25×10^6 menunjukkan tidak berbeda nyata. Sedangkan perlakuan yang lainnya menunjukkan hasil yang berbeda nyata. Lama waktu penyimpanan dengan konsentrasi spermatozoa yang berbeda memberikan hasil yang berbeda. Hal ini disebabkan karena terjadinya peluang pemakaian nutrisi antar spermatozoa pada setiap perlakuan berbeda. Lama penyimpanan dengan jumlah spermatozoa yang berbeda akan meningkatkan kematian spermatozoa yang

disebabkan rusaknya membran plasma yang mengakibatkan terganggunya suplai energi spermatozoa sehingga menurunkan motilitas (Solihati, dkk., 2006).

Keutuhan membran sel sangat menentukan proses metabolisme yang bergantung pada suplai energi ATP (Hayati, 2011). Membran yang rusak dapat menyebabkan produksi ATP terhambat akibat terganggunya lalu lintas keluar masuknya substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam metabolisme sel, sehingga sel tidak dapat melakukan metabolisme dengan baik (Bhintoro, 2012).

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan spermatozoa dengan konsentrasi spermatozoa yang berbeda memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa yang terbaik selama penyimpanan dengan CEP-D+KT20% pada temperatur $4-5^\circ \text{C}$ yaitu konsentrasi $15 \times 10^6/\text{ml}$ yang mampu mempertahankan persentase motilitas spermatozoa sebesar $42,50 \pm 1,18 \%$ selama 7 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhintoro PP, 2012. Pengaruh Tingkat Konsentrasi Spermatozoa dan Lama Waktu Penyimpanan Terhadap Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Ettawa (PE) Pada Pengencer Tris Aminomethan Kuning Telur. *Skripsi*. Tidak publikasikan. Malang: Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Ducha N, 2012. Suplementasi Kuning Telur dalam Pengencer CEP-2 Terhadap Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Pada Suhu $4-5^\circ \text{C}$. *Disertasi*. Tidak dipublikasikan. Malang: Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Garner DL, and Hafez ESE, 2000. Spermatozoa and Plasma Semen. Pp:96-109 In: Hafez, ESE and B Hafez (Eds): *Reproduction in Farm Animal* 7th Edn. Lippicott and Williams, Baltimore, Maryland, USA.
- Hardijanto, Susilowati, Hernawati, Sardjito, dan Suprayogi, 2010. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Hayati A, 2011. *Spermatologi*. Surabaya : Pusat Penerbit dan Percetakan Universitas Airlangga.
- Manjunath, P, 2012. New Insight Into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Animal Reproduction* 9 (4): 809-815
- Solihati N., Ruhijat I, Rangga S, IY Asmara, Bayu IS, 2006. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Cair Ayam Buras Pada Suhu 5°C Terhadap Periode

- Fertil dan Fertilisasi Sperma. *Jurnal Ilmu Ternak* 6 (1): 7-11.
- Sonjaya H, 2012, *Dasar Fisiologi Ternak*. Bogor: IPB Press.
- Susilawati T, 2011. *Spermatology*. Malang: Universitas Brawijaya (UB) Press.
- Toelihere MR, 1981. *Inseminasi buatan pada ternak*. Bandung : Penerbit Angkasa Bandung.
- Verberckmoes S, De Pauw I, Van Soom A, Dewulf J, and de Kruif A, 2004. Storage of fresh bovine semen in a diluent based on the ionic Composition of cauda epididymal plasma (CEP). *Reproduction in Domestic Animals* 39 (6): 1-7
- Vishwanath R, and P. Shanon, 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state". *Animal reproduction science* 62 (2000): 23-53
- Wahjuningsih S, Hermanto, Nuryadi AB, dan Bhintoro, 2012. Effect of Sperm Concentration and Length of Storage at 5 C Motility of Goat Spermatozoa. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 66
- Yitnosumarto S, 1993. *Percobaan Perancangan, Analisis, dan Interpretasinya*. Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.