

Pengaruh Berbagai Konsentrasi Gliserol dalam Pengencer Cep-D terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Brahman yang Disimpan dalam Nitrogen Cair

The Influence of Glycerol Concentration in Cep-D Diluent on The Motility of Brahman Bull Spermatozoa Stored in Liquid Nitrogen

Dian Oktavia Sari*, Tjandrakirana, Nur Ducha

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: octaviafavorita@yahoo.com

ABSTRAK

Spermatozoa yang disimpan dalam nitrogen cair seringkali mengalami kerusakan karena terbentuknya kristal es. Pembentukan kristal es dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa *pasca thawing* terutama penurunan motilitas. Penambahan krioprotektan dalam pengencer dapat meminimalisir kerusakan sel. Salah satu jenis krioprotektan yang sering digunakan pada mamalia adalah gliserol. Penelitian ini bertujuan untuk mendeskripsikan pengaruh penambahan gliserol dalam pengencer CEP-D terhadap motilitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dalam nitrogen cair. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 4 pengulangan. Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan setelah penyimpanan selama 24 jam dalam nitrogen cair. Data dianalisis dengan uji normalitas dan homogenitas, kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA satu arah pada taraf ketelitian 95%. Hasil motilitas spermatozoa pada masing-masing konsentrasi gliserol (0%, 3%, 5%, 6% dan 7%) berturut-turut sebesar $3,00 \pm 0,00$, $25,00 \pm 2,71$, $26,25 \pm 1,61$, $32,50 \pm 3,14$ dan $38,75 \pm 0,85$. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan gliserol dalam pengencer CEP-D dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dalam nitrogen cair. Penambahan gliserol dengan konsentrasi 7% dalam pengencer CEP-D paling baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Brahman dengan nilai motilitas sebesar $38,75 \pm 0,85$ dibandingkan dengan konsentrasi 0%, 3%, 5% dan 6%.

Kata kunci: gliserol; pengencer CEP-D; spermatozoa sapi Brahman; motilitas.

ABSTRACT

Spermatozoa is easily damaged during freezing process due to the formation of ice crystal. The formation of ice crystals caused decrease of the quality of spermatozoa post thawing primarily decrease motility. The addition of cryoprotectants in diluents can minimized damage of the cells. For most mammalian sperm cryopreservation, glycerol has been widely used as the cryoprotectant. This research aimed to prove that the addition of glycerol in the CEP-D diluent could maintain the quality of Brahman bull spermatozoa stored in liquid nitrogen. Experiment design used is completely randomized design (CRD), consisted of 5 treatments and 4 replication. The motility observation of spermatozoa were done after 24 hours of storage in liquid nitrogen. Data were analyzed with tests of normality and homogeneity, then proceed with the one way ANOVA on the significancy level of 95%. The results of motility of spermatozoa in each glycerol concentration (0%, 3%, 5%, 6% and 7%) respectively of $3,00 \pm 0,00$, $25,00 \pm 2,71$, $26,25 \pm 1,61$, $32,50 \pm 3,14$ and $38,75 \pm 0,85$. The addition of glycerol in the CEP-D diluent also able to maintain the motility of Brahman bull spermatozoa stored in liquid nitrogen. The addition of 7% glycerol in CEP-D diluent could maintain motility of Brahman bull spermatozoa with the percentage of motility was $38.75 \pm 0.85\%$.

Key words: glycerol; diluent CEP-D; spermatozoa of Brahman bull; motility.

PENDAHULUAN

Pada proses pembekuan semen, masalah yang sering timbul pada umumnya disebabkan oleh pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan intraseluler serta terjadinya penumpukan elektrolit (Afiati dkk., 2004). Semen beku yang berkualitas tinggi, membutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun saat *thawing* (Aboagla dan Terada, 2004).

Penambahan bahan pengencer bertujuan untuk menyediakan sumber energi bagi spermatozoa sehingga menjamin kelangsungan hidup sperma selama penyimpanan atau pembekuan (Salisbury dan Vandemark, 1985). Salah satu pengencer yang sedang dikembangkan saat ini adalah pengencer CEP-D (*Cauda Epididymal Plasma -D*). Pengencer CEP-D memiliki komposisi biokimia hampir sama dengan *cauda epididymal plasma* dari sapi.

Penggunaan bahan pengencer umumnya diikuti dengan penambahan zat krioprotektan

untuk melindungi spermatozoa dari efek yang mematikan selama proses penyimpanan pada suhu rendah (Tambing dkk., 2000). Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler yaitu krioprotektan dengan molekul besar yang tidak dapat menembus membran sel (Supriatna, 1993). Pada proses pembekuan, selain krioprotektan ekstraseluler juga dibutuhkan krioprotektan intraseluler. Leboeuf *et al.* (2000) menyatakan bahwa gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang paling banyak digunakan untuk pembekuan semen. Gliserol dapat masuk ke dalam sel spermatozoa untuk mengikat sebagian air bebas, sehingga kristal-kristal es yang terbentuk di dalam medium pengencer pada waktu pembekuan dapat dicegah (Azizah dan Arifiantini, 2009). Konsentrasi gliserol yang digunakan berbeda tergantung jenis semen serta pengencer yang digunakan (Azizah dan Arifiantini, 2009). Setiap jenis pengencer umumnya memiliki komponen yang berbeda sehingga memiliki kemampuan dan cara yang berbeda dalam mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa (Hardijanto dkk, 2010). Nugroho (2003) berpendapat bahwa motilitas atau daya gerak dapat dijadikan patokan dalam menilai kualitas semen. Penelitian ini dilakukan untuk mendeskripsikan pengaruh penambahan gliserol dalam pengencer CEP-D dalam mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dalam nitrogen cair.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian adalah eksperimen murni. Penelitian dilakukan pada bulan Juni – Juli 2014 di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah semen segar Brahman yang diencerkan dalam pengencer CEP-D. Bahan yang digunakan untuk pembuatan CEP-D yaitu NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , fruktosa, sorbitol, BSA, tris, penisilin, streptomisin, asam sitrat dan kuning telur (ayam petelur strain *hisex brown*). Bahan-bahan tersebut dihomogenkan dengan *deionized water*. Setelah pengencer CEP-D dibuat dilakukan suplementasi kuning telur dengan konsentrasi kuning telur 20%. Hasil suplementasi pengencer CEP-D ditambahkan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi gliserol yang digunakan dalam penelitian adalah 0%, 3%, 5%, 6% dan 7%.

Pemeriksaan kualitas semen segar yang meliputi warna semen, volume semen, pH, konsistensi, konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas dilakukan terlebih dahulu. Selanjutnya dilakukan pengenceran dalam 3

tahapan. Pengenceran tahap 1 dilakukan pada suhu 33-34°C dengan perbandingan pengencer dan semen segar 1:1. Pengenceran tahap 2 dilakukan setelah larutan semen dan pengencer mencapai suhu 4-5°C. Perhitungan volume larutan pengencer tahap 2 yang akan ditambahkan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V_{A2} \text{ yang ditambahkan} = \frac{V_{\text{total}}}{2} - \sum \text{Vol. semen} + \text{Volume A1}$$

Volume total diperoleh dari rumus :

$$V_{\text{total}} = \frac{V_{\text{semen}} \times \text{konsentrasi spermatozoa} \times 0,25}{25 \times 10^6}$$

Pengenceran tahap 3 dilakukan 22 jam setelah spermatozoa disimpan pada suhu 4-5°C. Adapun jumlah pengencer yang ditambahkan dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$V_{\text{pengencer B yang ditambahkan}} = \frac{V_{\text{total}}}{2}$$

Semen yang telah diencerkan selanjutnya diperiksa kualitasnya. Tahap ini disebut *Evaluasi Before Freezing*, kemudian dilakukan pengemasan dalam *straw*. *Straw* yang berisi semen diekuilibrasi di dalam *cool top* yang bersuhu 3-5°C. Selanjutnya *straw* diletakkan pada rak susun di dalam kontainer yang berisi nitrogen cair dengan ketinggian nitrogen cair ± 2 cm di bawah rak susun selama ± 10 menit untuk melakukan tahap *pre freezing*. *Straw* dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi nitrogen cair secara perlahan untuk mengadaptasi suhu hingga *straw* terendam nitrogen cair. *Thawing* semen beku dilakukan dengan memasukkan *straw* ke dalam air hangat bertemperatur 35-37°C selama 30 detik. Tahap berikutnya adalah melakukan pengamatan motilitas spermatozoa. Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan dengan membandingkan spermatozoa hidup yang bergerak ke depan dengan konsentrasi spermatozoa total dalam semen.

Data berupa persentase motilitas ditransformasikan terlebih dahulu dengan menggunakan transformasi arc sin untuk selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan SPSS 17 *for windows*. Pengujian data dilakukan menggunakan uji *One Sample Kolmogorov-Sminorov* untuk menentukan distribusi data. Data yang berdistribusi normal diuji menggunakan ANOVA satu arah, dilanjutkan dengan uji beda nyata menggunakan uji Duncan.

HASIL

Data rerata persentase motilitas spermatozoa sapi Brahman dalam pengencer CEP-D dengan konsentrasi gliserol yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pengamatan rerata motilitas spermatozoa *before freezing* dan *post thawing* menunjukkan bahwa bahwa motilitas spermatozoa *before freezing* lebih tinggi dari *post thawing*. Hal ini menunjukkan bahwa proses

pembekuan semen menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Rerata motilitas spermatozoa *before freezing* tidak berbeda nyata antar perlakuan. Rerata motilitas *post thawing* yang terendah terdapat pada perlakuan kontrol tanpa gliserol yaitu sebesar 3,00%, sedangkan rerata motilitas *post thawing* tertinggi terdapat pada penambahan gliserol dengan konsentrasi 7% dengan rerata motilitas sebesar 38,75%.

Tabel 1. Rerata Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Brahman dengan Berbagai Konsentrasi Gliserol Dalam Pengencer CEP-D (%)

Tahapan Pengamatan	Perlakuan Gliserol				
	0%	3%	5%	6%	7%
<i>Before Freezing</i>	53,13±0,72 ^a	53,75±1,44 ^a	53,75±0,83 ^a	53,75±1,37 ^a	52,50±1,66 ^a
<i>Post Thawing</i>	3,00±0,00 ^a	25,00±2,71 ^b	26,25±1,61 ^b	32,50±3,14 ^c	38,75±0,85 ^d

Keterangan : Notasi dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$)

PEMBAHASAN

Masalah utama dari penyimpanan semen beku adalah kematian sel yang diakibatkan oleh terbentuknya kristal es intraseluler. Saat terjadi pembekuan, medium di sekeliling sel membeku antara -5 °C sampai -15°C. Keberadaan membran sel dapat berfungsi mencegah berkembangnya kristal es ekstraseluler ke arah intraseluler yang menyebabkan air intraseluler tidak membeku dan mengalami *supercooled* (Henry dkk., 1993). Potensial kimia air yang mengalami *supercooled* lebih tinggi daripada potensial kimia air yang membeku di luar sel. Hal tersebut menyebabkan air berdifusi keluar sel yang mengakibatkan potensial kimia air intraseluler menembus membran, dan selanjutnya gradien potensial kimia air menurun secara cepat seiring dengan pelepasan panas laten sehingga menyebabkan temperatur intraseluler dan ekstraseluler menyatu sampai mencapai titik beku (Mazur, 1977).

Keberadaan gliserol dalam pengencer sangat penting untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa selama dan sesudah pembekuan semen. Gliserol dapat langsung masuk ke dalam sel melalui cara difusi, menembus membran plasma karena larut dalam lemak (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Pada saat medium ditambahkan akan terjadi reaksi osmotik, sel akan kehilangan air. Selanjutnya sel akan mengabsorpsi krioprotektan gliserol sehingga volume sel pulih kembali. Masuknya gliserol ke dalam sel mengakibatkan berkurangnya air intraseluler sehingga pembentukan kristal es intraseluler berkurang (Wetzels, 1996).

Mikrotubulus dapat mengalami kerusakan pada proses pendinginan akibat dari terbentuknya kristal es. Apabila mitokondria rusak dan rantai oksidasi putus menyebabkan flagel yang merupakan alat gerak spermatozoa tidak dapat bergerak karena tidak ada pasokan energi dari organel mitokondria. Sumber energi mitokondria berperan untuk menggerakkan mikrotubul sehingga terjadi pergesekan di antara molekul mikrotubul sehingga spermatozoa dapat bergerak (motil) (Gazali dan Tambing, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan gliserol dengan konsentrasi 7% dalam pengencer CEP-D menghasilkan persentase motilitas yaitu 38,75%. Nilai motilitas tersebut relatif lebih tinggi dibandingkan dengan penambahan gliserol pada konsentrasi 0%, 3%, 5% dan 6% dengan motilitas 3,00%, 25,00%, 26,25% dan 32,50%. Pada perlakuan tanpa gliserol atau konsentrasi gliserol 0% menunjukkan nilai motilitas yang rendah. Hal itu disebabkan karena banyak terbentuk kristal es akibat tidak adanya perlindungan dari gliserol sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sel dan membran mitokondria yang mengakibatkan spermatozoa tidak memperoleh energi untuk pergerakan flagel. Pada konsentrasi gliserol 3%, 5% dan 6% menunjukkan nilai motilitas yang lebih tinggi dari konsentrasi gliserol 0% dan lebih rendah dari konsentrasi gliserol 7%. Konsentrasi gliserol 3%, 5% dan 6% dapat memberikan perlindungan pada proses pembekuan, akan tetapi perlindungan tersebut belum optimal karena masih ada kristal es yang terbentuk yang dapat mengganggu pergerakan spermatozoa. Hal

tersebut menunjukkan bahwa penambahan gliserol 7% dalam pengencer CEP-D mampu memberikan perlindungan yang optimal untuk kelangsungan hidup spermatozoa selama berlangsungnya proses pembekuan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ihsan (2013) bahwa penambahan gliserol 7% dalam pengencer Andromed mampu mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer sebesar $30,00 \pm 12,65\%$.

Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa selama proses pembekuan jika konsentrasinya di dalam pengencer optimal. Walaupun gliserol dapat memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa, namun juga dapat merusak struktur spermatozoa selama proses pembekuan semen (Gazali dan Tambing, 2002). Dalam keadaan aerob, gliserol berfungsi sebagai penghasil fruktosa dan sedikit asam laktat. Hal tersebut juga dijelaskan oleh Ihsan (2013) bahwa proses metabolisme fruktosa oleh spermatozoa akan menghasilkan energi dan sedikit asam laktat, namun apabila konsentrasi gliserol dalam pengencer berlebih/terlalu tinggi, maka akan terbentuk lebih banyak asam laktat. Asam laktat ini dapat menurunkan pH dan bersifat racun bagi spermatozoa.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan gliserol dalam pengencer CEP-D dapat mempertahankan kualitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dalam nitrogen cair. Penambahan gliserol dengan konsentrasi 7% dalam pengencer CEP-D paling baik mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dalam nitrogen dengan nilai motilitas sebesar sebesar dibandingkan dengan konsentrasi 0%, 3%, 5% dan 6%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang yang telah bersedia menyediakan Laboratorium, alat dan bahan, sehingga penelitian mengenai Pengaruh Berbagai Konsentrasi Gliserol dalam Pengencer CEP-D terhadap Kualitas

Spermatozoa Sapi Brahman yang Disimpan dalam Nitrogen Cair dapat terselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME dan Terada T, 2004. Effects of supplementation of trehalosa extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Journal Theriogenolog*, 62: 809-818.
- Afiati F, Kaiin EM, Gunawan M, Saiid S dan Tappa B, 2004. Kualitas dan kemampuan hidup sperma beku sapi PO setelah thawing. *J. Protein*, 11 (2): 205-212 .
- Azizah dan Arifiantini, 2009. Kualitas Semen Beku Kuda Pada pengencer Susu Skim dengan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda. *Jurnal Veteriner*, 10 (2): 63-70.
- Gazali M dan Tambing SN, 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Jurnal Hayati*, 9 (1): 27-32
- Hardijanto, Susilowati, Hernawati, Sardjito, dan Suprayogi, 2010. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critzer JK, 1993. Cryopreservation of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 60 (5) : 911 - 917
- Ihsan MN, 2013. Pembekuan Vitriifikasi Semen Kambing Boer Dengan Tingkat Gliserol Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*, 14 (2): 38-45
- Leboeuf B, Restall B dan Salmon S, 2000. Production and Storage of Goat Semen for Artificial Insemination. *Animal Reproduction Science*, 62: 113-141.
- Mazur P, 1977. The Role of Intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates. *Journal Cryobiology*, 14 : 251-272
- Nugroho WE, 2003. Efektifitas Konsentrasi Kuning Telur dan Plasma Semen Pada Bahan Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Beku Saenen. *Skripsi*. Tidak dipublikasikan. Bogor: IPB
- Salisbury GW dan Vandemark NL, 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan*. diterjemahkan oleh R. Djanuar. Yogyakarta : UGM Press.
- Supriatna, 1993. *Metode Dasar Dalam Pembekuan Embrio Mamalia*. Bogor: IPB
- Supriatna I dan Pasaribu FH, 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Pusat Antar universitas. Bogor: IPB.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Utama IK, 2000. Kualitas Semen beku kambing peranakan Ettawa Setelah Ekuilibrasi. *Jurnal Hayati*, 5 (2): 70-75
- Wetzels AMM, 1996. IVF Laboratory Aspects of In-Vitro Fertilization. *N. V. Organon*. Netherlands. 16: 228-240.