

## ***Longivity dan Recovery Rate Pasca-thawing Semen Beku Sapi PO Menggunakan Pengencer Tris dengan Berbagai Tingkat Fruktosa sebagai Sumber Energi pada Suhu Inkubasi 39°C***

**(Longivity and Recovery Rate of PO Bulls Semen with Different Levels of Fructose as a Source of Energy in 39°C Incubation Temperature)**

Tri Agus Sulistya, Widyaningrum Y, Ratnawati D

Loka Penelitian Sapi Potong, Jl. Pahlawan No. 2, Grati, Pasuruan 67814  
[bapakelintang@gmail.com](mailto:bapakelintang@gmail.com)

### **ABSTRACT**

The purpose of this research was to determine longivity and recovery rate (recovery after thawing) frozen semen of Ongole cross bulls using Tris Fructose (TF) in various levels of fructose. Semen was collected from selected bulls and evaluated by for diluting using TF with fructose 1% (P1), 1.5% (P2), 2% (P3) and 2.5% (P4). Semen was equilibrated at 4°C for 4 hours, and then frozen with liquid N<sub>2</sub> vapor for 15 minutes before immersed in liquid N<sub>2</sub> for 24 hours. After 24 hours, semen was thawed under running water and then incubated using a water bath at 39°C. The variable measured were recovery rate (RR) and longivity of spermatozoa. Result showed that the use of diluent tris-fructose with the level of fructose as an energy source (1, 1.5, 2 and 2.5%) at 39°C incubation temperature had no effect on RR and longivity.

**Key Words:** Longivity, Recovery Rate, Semen Diluter, Tris Fructose

### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui longivitas dan *recovery rate* (RR) (pemulihan spermatozoa setelah pembekuan) semen beku sapi Peranakan Ongole (PO) menggunakan pengencer Tris Fruktosa (TF) dengan berbagai tingkat fruktosa. Semen dikoleksi dari pejantan terpilih sapi PO Loka Penelitian Sapi Potong menggunakan vagina buatan. Ejakulat hasil penampungan dievaluasi dan diencerkan menggunakan pengencer TF dengan kadar fruktosa 1% (P1), 1,5% (P2), 2% (P3) dan 2,5% (P4). Semen diequilibrasi pada suhu 4°C selama 4 jam, dan dibekukan dengan uap N<sub>2</sub> cair selama 15 menit sebelum direndam dalam N<sub>2</sub> cair selama 24 jam. Setelah penyimpanan 24 jam semen beku dilakukan *thawing* menggunakan air mengalir hingga mencair dan diinkubasi dalam penangas air pada suhu 39°C sesuai dengan suhu saluran reproduksi sapi betina. Variabel yang diamati adalah *recovery rate* (RR) dan longivitas spermatozoa berdasarkan motilitasnya tiap jam hingga spermatozoa mati. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa longivitas semen antar perlakuan P1, P2, P3 dan P4 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, dan pada jam ke-3 tingkat motilitas berada di bawah 10% pada seluruh perlakuan. Kesimpulan dari kegiatan ini adalah penggunaan pengencer tris dengan tingkat fruktosa sebagai sumber energi (1; 1,5; 2 dan 2,5%) pada suhu inkubasi 39°C tidak berpengaruh pada longivitas dan RR *pasca-thawing* semen beku sapi PO.

**Kata Kunci:** Longivitas, *Recovery Rate*, Pengencer Semen, Tris Fruktosa

### **PENDAHULUAN**

Sejak inseminasi buatan (IB) pertama kali diperkenalkan di Indonesia oleh Prof. Bore Seit dari Denmark pada tahun 1952 dengan istilah lazim “kawin suntik”, perkembangan dunia peternakan Indonesia menapaki sejarah baru dalam perbaikan mutu dan produksi

ternak. Hal ini disebabkan penerapan sistem IB diyakini telah mengurangi biaya perawatan sapi pejantan dan dapat meningkatkan mutu genetik hasil perkawinan IB.

Dalam perkembangannya, teknologi IB masih menyisakan permasalahan yang kurang menguntungkan bagi peternak. Permasalahan yang lazim ditemui di tingkat peternak adalah tingginya *Service per Conception* (S/C) dan rendahnya presentase kebuntingan atau *Conception Rate* (CR). Beberapa nilai S/C yang pernah dilaporkan di beberapa daerah di Pulau Jawa seperti di Grobogan dan Wonosobo Jawa Tengah, nilai S/C sapi PO adalah 2,6 sedangkan di Jawa Timur 2,0-2,2 dan di Bantul Yogyakarta 2,1-2,3 Susilo (2005). Nilai ini belum sesuai dengan harapan, karena menurut Toelihere (1993) nilai S/C yang normal berkisar 1,6 sampai 2,0.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengatasi permasalahan tingginya S/C pada perkawinan IB, salah satunya dengan memperbaiki kualitas pengencer semen beku dengan parameter terukur adalah *post thawing motility* hingga tingkat longivitas dan *recovery rate* (RR) (pemulihan spermatozoa setelah pembekuan). Arifiantini et al. (2005) melaporkan bahwa nilai RR untuk semen sapi FH yang diencerkan menggunakan pengencer Tris Fruktosa (TF) sebesar 63,48% dan motilitas sperma hingga 10% didapatkan pada jam inkubasi ke 5 pada suhu 37°C. Sinha et al. (1992) melaporkan bahwa penambahan gliserol sebesar 6% dalam pengencer memberikan persentase motilitas yang lebih tinggi (58,10%) sesudah *thawing* dibandingkan dengan penambahan gliserol sebesar 5% (57,93%) dan 7% (57,93%). Toelihere (1993) menyatakan bahwa sumber nutrisi semen yang paling banyak digunakan adalah karbohidrat terutama fruktosa karena paling mudah dimetabolisasi oleh spermatozoa.

Berdasarkan pertimbangan tersebut diatas maka tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan kadar optimum fruktosa dalam pengencer semen untuk menunjang longivitas spermatozoa sapi PO pada suhu 39°C (sesuai suhu uterus sapi).

## MATERI DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Reproduksi Loka Penelitian Sapi Potong pada bulan Juni 2015.

### Bahan dan penyiapannya

Bahan-bahan pengencer ditimbang dan dicampur pada hari yang sama dengan hari penampungan sesuai dengan komposisinya.

### Penampungan semen

Semen ditampung dengan vagina buatan pada pukul 08.00-09.00 WIB. Penampungan dijadikan ulangan dengan maksimal penampungan dua kali seminggu.

### Evaluasi semen segar

Semen dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis untuk menentukan kelayakan pemrosesan semen. Evaluasi secara makroskopis dilakukan dengan mengamati volume, warna, konsistensi dan pH (derajat keasaman) semen.

Volume semen diamati dengan menggunakan tabung penampung berskala yang dinyatakan dalam ml/ejakulasi. Penilaian warna semen dilakukan dengan mengamati semen yang ditampung sedangkan konsistensi semen diperiksa dengan cara memiringkan tabung yang berisi sperma secara perlahan-lahan dimana semen yang baik derajat kekentalannya akan bergerak sangat lambat mengikuti tabung penampung. Penilaian pH semen dapat dilakukan dengan menggunakan kertas lakmus yang dicelupkan ke dalam semen, perubahan warna pada kertas lakmus dicocokkan dengan warna pada kertas kalibrasi.

Setelah semen dievaluasi kemudian dilakukan pengenceran dengan TF. Komposisi bahan pengencer semen tercantum di Tabel 1.

**Tabel 1.** Komposisi bahan pengencer semen

Bahan	Komposisi berdasarkan perlakuan			
	P1	P2	P3	P4
Tris (g)	3,028	3,028	3,028	3,028
Asamsitrat (g)	1,675	1,675	1,675	1,675
Kuningtelur (ml)	20	20	20	20
Gliserol (mL)	5	5	5	5
Penisilin (IU)	500.000	500.000	500.000	500.000
Streptomisin (mg)	50	50	50	50
Fruktosa (g)	<b>1</b>	<b>1,5</b>	<b>2</b>	<b>2,5</b>
Aquabides (ml) <i>up to</i>	100	100	100	100

### Penghitungan gerak masa dan konsentrasi

Prosedur analisis semen sesuai dengan metode yang dilakukan Toelihere (1993) dalam Ratnawati (2008). Penilaian gerak masa ada tiga, diantaranya: (+) gerakan lambat; (++) gerakan cepat tidak berawan; (+++) gerakan cepat seperti awan. Perhitungan konsentrasi spermatozoa dengan rumus: Jumlah sperma pada 5 kotak kamar hitung Neubauer x 400 (pengenceran) x 50.000 (volume tabung).

### Pengenceran sperma dan pembekuan

Kadar pengencer tergantung pada volume ejakulat, konsentrasi serta persentase sperma hidup dan motil progresif. Pengenceran dilakukan dalam tabung reaksi steril Rusdin (1997). Cara pengenceran yaitu, dengan memasukkan bahan pengencer ke dalam tabung reaksi yang berisi semen melalui dinding tabung. Agar larutan homogen, dilakukan pencampuran dengan cara membolak-balikan tabung reaksi dengan perlahan-lahan. Volume pengencer dihitung dengan mendapatkan turunan dari rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi}_1 \times \text{Volume}_1 = \text{Konsentrasi}_2 \times \text{Volume}_2$$

Target pengenceran yang dilakukan adalah konsentrasi 100 juta spermatozoa/ml. Sebanyak 1 ml semen ditempatkan pada tabung reaksi plastik dan dilakukan equilibrasi selama 4 jam pada suhu 4°C. Semen yang telah dingin dilakukan pembekuan pada uap N<sub>2</sub> cair dengan jarak 10 cm dari permukaan N<sub>2</sub> cair selama 15 menit kemudian dilakukan perendaman ke dalam N<sub>2</sub> cair selama 24 jam.

## Thawing dan pengambilan data

*Thawing* segera dilakukan setelah semen dikeluarkan dari N<sub>2</sub> cair menggunakan air mengalir selama 30 detik. Setelah semen mencair kembali dilakukan inkubasi pada penangas air suhu 39°C (sesuai dengan rata-rata suhu uterus dari tiga ekor sapi betina). Pengambilan data parameter motilitas dilakukan setiap jam sekali dimulai sejak *pasca-thawing* hingga spermatozoa mati.

## Analisis data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut Steel & Torrie (1991) dengan perlakuan empat kadar fruktosa dan dilakukan secara empat kali penampungan sebagai ulangan. Seluruh data yang diolah menggunakan aplikasi SPSS ver. 16.0, disajikan dalam bentuk rataan dan simpangan baku.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi rata-rata semen segar yang dilakukan pada empat kali ulangan. Hasil evaluasi kualitas semen segar setelah empat kali penampungan tersaji dalam Tabel 2. Volume rata-rata yang didapatkan adalah sebanyak 4,1 ml. Hasil ini masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil kisaran normal volume ejakulasi sapi sebesar 5-8 ml (Garner & Hafez 2000). Banyak faktor yang bisa mempengaruhi volume ejakulat, diantaranya karena perbedaan individu, kualitas nutrisi, umur ternak, frekuensi ejakulasi, bangsa ternak dan ataupun iklim. Warna semen segar yang didapatkan dari empat kali ulangan adalah putih susu. Warna semen tidak terlalu mempengaruhi kualitas semen karena warna hanya berhubungan dengan pigmen, meskipun warna normal untuk semen sapi menurut Bearden & Fuquay (1997) adalah putih krem. Warna yang pekat dapat dijadikan indikasi tingkat konsentrasi spermatozoa (Rouge 2003).

**Tabel 2.** Profil kualitas semen segar

Parameter	Nilai rata-rata dari empat kali ulangan
Volume (ml)	4,1
Warna	Putih susu
Konsistensi	Kental
pH	7,1
Gerak massa	+++
Konsentrasi sperma (juta ml <sup>-1</sup> )	1.645
Motilitas sperma (%)	81,3

Rata-rata konsistensi semen dari empat kali penampungan adalah kental sedangkan derajat keasaman (pH) rata-rata dari empat kali penampungan adalah 7,1. Derajat keasaman dapat mempengaruhi viabilitas spermatozoa, namun derajat keasaman semen yang didapatkan dari empat kali penampungan ini masih dalam kisaran normal, yaitu masih dalam kisaran 6,4 sampai dengan 7,8 (Garner & Hafez 2000).

Gerak masa yang didapatkan dari empat kali penampungan adalah +++ (positif 3), hal ini menunjukkan bahwa gerakan spermatozoa cukup aktif dan semen dapat dikategorikan semen dengan kualitas baik sehingga dapat dijadikan bahan pembuatan semen beku. Rataan konsentrasi dari empat kali ulangan adalah sebesar 1.645 juta spermatozoa/ml.

Konsentrasi ini tergolong tinggi mengingat kisaran normal konsentrasi semen sapi dewasa menurut Campbell et al. (2003) adalah antara 800-200 juta spermatozoa/ml. Sedangkan menurut Garner & Hafez (2000) kisaran konsentrasi semen sapi dewasa adalah 800-2000 juta spermatozoa/ml. Pejantan sapi PO yang digunakan sebagai donor semen untuk penelitian ini sudah tergolong dewasa dengan umur >5 tahun dan bobot saat penampungan sebesar 637 kg.

Motilitas merupakan faktor yang menentukan bagi spermatozoa untuk melewati serviks ketika terjadi perkawinan alam. Spermatozoa yang motil terutama spermatozoa dengan gerakan progresif menentukan dalam proses penembusan kumulus ooforus dan zona *pelucida* ovum sehingga fertilisasi dapat terjadi (Garner & Hafez 2000). Rataan motilitas sperma segar pada empat kali ulangan adalah 81,3% dan tergolong tinggi. Nilai motilitas dapat dipergunakan untuk menggambarkan kisaran sperma hidup secara kasar, dan kebanyakan jumlah sperma hidup lebih tinggi dari hasil pengamatan motilitas. Hal ini dikarenakan sperma hidup belum tentu motil. (Campbell et al. 2003)

### ***Recovery rate pasca-thawing***

*Recovery rate* (RR) adalah kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa setelah *thawing* dengan motilitas spermatozoa segar (Hafez 2000). Nilai rata-rata RR dari keempat perlakuan tersaji pada Tabel 3. Hasil analisis statistik uji beda nyata tidak didapatkan perbedaan signifikan nilai RR pada keempat perlakuan. Nilai RR pada masih dalam kisaran normal.

**Tabel 3.** *Recovery Rate* semen beku pada tiap perlakuan

Perlakuan	Motilitas sperma (%)		<i>Recovery rate</i>
	Segar	<i>Pasca-thawing</i>	
P1	81,25±2,5	25,00±9,13	30,97±11,82 <sup>a</sup>
P2		20,00±5,77	24,72±7,55 <sup>a</sup>
P3		21,25±11,09	26,47±14,04 <sup>a</sup>
P4		21,25±11,09	26,38±14,11 <sup>a</sup>

Tidak adanya perbedaan RR yang nyata menunjukkan bahwa kadar fruktosa pada pengencer pada kisaran 1% sudah cukup optimum untuk menjaga motilitas *pasca-thawing*. Hasil penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Hafez (2000) yang menyatakan bahwa spermatozoa yang dibekukan akan mengalami kerusakan sekitar 40%. Arifiantini et al. (2005) melaporkan bahwa nilai RR semen beku pada tiga jenis pengencer TF, Tris Kuning Telur (TKT) dan pengencer paten AndroMed (*Minitub Germany*) masing masing sebesar 59,40; 63,48 dan 69,66%. Sedangkan Komariah (2013) melaporkan nilai Rr semen beku pada tiga bangsa sapi Limousin, Simmental dan *Frisien Holstein* masing-masing sebesar 58,87; 56,27 dan 58,87%. Dengan demikian hasil nilai RR yang tertinggi pada penelitian ini (P1) masih jauh berada di bawah hasil penelitian Arifiantini et al. (2005) maupun Komariah (2013).

### ***Post-thawing motility***

*Post-thawing motility* adalah pengujian motilitas spermatozoa setelah dibekukan dengan cara melakukan *thawing* sperma beku pada suhu 37°C selama 30 detik. Hasil pengamatan *post-thawing motility* tersaji pada Tabel 4 baris pertama (Pengamatan 0 jam).

Persentase minimal *straw* semen beku untuk dapat diinseminasikan adalah 40% (Hafez, 2000). Sedangkan menurut Campbell et al. (2003) persentase sperma motil *pasca-thawing* untuk dapat diinseminasikan adalah 30%. Pada kegiatan penelitian ini didapatkan *post-thawing motility* yang rendah. Hal ini diduga karena pembekuan N<sub>2</sub> cair yang dilakukan pada kegiatan penelitian ini menggunakan tabung reaksi bukan *plastic straw*, sehingga proses pembekuan antara suhu -15°C hingga -60°C tidak berjalan serempak, mengingat volume semen pada tabung reaksi lebih besar dari pada *straw*. Menurut Parks & Graham (1993) kerusakan membran spermatozoa terjadi pada suhu -15°C sampai dengan -60°C sehingga pada suhu tersebut merupakan fase krusial dan tidak ada kerusakan pada saat penyimpanan dalam cairan N<sub>2</sub> cair. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa *post-thawing motility* pada kegiatan penelitian ini tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan, dengan demikian penambahan fruktosa dari 1; 1,5; 2; dan 2,5% tidak berpengaruh pada *post-thawing motility*.

**Tabel 4.** Motilitas sperma pada tiap jam pengamatan

Jam pengamatan	Motilitas sperma (%)			
	P1	P2	P3	P4
0	25,00±9,13	20,00±5,77	21,25±11,09	21,25±11,09
1	17,50±6,45	22,50±10,41	20,20±4,08	20,20±10,80
2	8,75±4,79	5,00±0,00	8,75±2,50	5,00±0,00
3	1,25±2,5	0,00±0,00	1,25±2,50	0,00±0,00

Longivitas spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa bertahan pada temperatur tertentu. Pada kegiatan penelitian ini menggunakan suhu 39°C yang merupakan hasil rata-rata pengukuran suhu uterus dari 3 ekor sapi betina menggunakan *thermometer stick*. Hasil longivitas spermatozoa pada kegiatan penelitian ini tersaji pada Tabel 4, dimana motilitas spermatozoa dapat bertahan sampai dengan kisaran 5-10% pada jam kedua pengujian. Arifiantini (2005) mendapatkan longivitas semen beku mencapai 6 jam untuk pengencer lesitin dan berbeda nyata ( $P < 0,01$ ) dengan pengencer TF maupun TKT. Rendahnya longivitas spermatozoa pada kegiatan penelitian ini diduga karena suhu inkubasi yang tinggi 39°C, yang memicu metabolisme dan gerakan spermatozoa lebih cepat sehingga energi lebih cepat habis. Sedangkan peningkatan kadar fruktosa tidak meningkatkan longivitas spermatozoa, mengindikasikan bahwa fruktosa diatas 1% tidak tergunakan atau dengan kata lain kadar efektif fruktosa adalah pada kisaran 1%. Berdasarkan hasil pengujian statistik tidak ditemukan perbedaan nyata antar perlakuan, dengan demikian penambahan fruktosa 1, 1,5, 2 dan 2,5% pada pengencer TF tidak mempengaruhi longivitas semen beku. Hal ini menunjukkan bahwa fruktosa tidak mempengaruhi daya tahan/longivitas semen beku akan tetapi karena penambahan agen lain. Salisbury & Vandemark (1985) menyatakan longivitas dapat diperpanjang dengan penambahan *phospholipid* dalam bentuk *lecitin*.

## KESIMPULAN

Penambahan fruktosa pada pengencer tris-fruktosa dengan kadar 1; 1,5; 2 dan 2,5% tidak mempengaruhi *post-thawing motility*. Penambahan tersebut juga tidak mempengaruhi longivitas semen beku yang diinkubasi pada suhu 39°C.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini I, Yusuf TL, Graha N. 2005. Longivitas dan recovery rate *pasca*-thawing semen beku sapi Frisian Holstein menggunakan bahan pengencer berbeda. *Bul Peternakan*. 29:53-61.
- Bearden HJ, Fuquay JW. 1997. Semen collection. In: *Applied animal reproduction*. 4th Ed. New Jersey (US): Mississippi State University. pp. 147-157.
- Campbell JR, Campbell KL, Kenealy MD. 2003. Artificial insemination. In: *Anim Sci*. 4th Ed. New York (US): Mc Graw-Hill.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in farm animals*. 7th Ed B Hafez/ESE Hafez. New York (USA): Lippincott Williams & Wilkins. 96-109.
- Hafez ESE. 2000. Presevation and cryopreservation of gametes and embryos. In: *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Hafez ESE, Hafez B, editors. Philadelphia (Pennsylvania): Lippincott Williams & Wilkins.
- Komariah, Arifiantini I, Nugraha FW. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi Simmental, Limousin dan Frisian Holstein terhadap proses pembekuan. *Bul Peternakan*. 37:143-147.
- Parks JE, Graham K. 1992. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenol*. 38:209-222.
- Ratnawati D, Affandhy L, Pratiwi WC, Prihandini PW. 2008. Pengaruh pemberian suplemen tradisional terhadap kualitas semen pejantan sapi Bali. Dalam: Sani Y, Martindah E, Nurhayati, Puastuti W, Sartika T, Parede L, Anggraeni A, Natalia L, penyunting. *Inovasi Teknologi Mendukung Pengembangan Agribisnis Peternakan Ramah Lingkungan*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 11-12 November 2008. Bogor (Indonesia): Puslitbangnak. hlm. 116-121.
- Rouge M. 2003. Sperm motility. [Internet]. [cited 20 Juni 2015]: Available from: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/pathpyys/reprod/semeneval/motility.html>.
- Rusdin. 1997. Pengaruh macam pengencer dan lama pembekuan terhadap kualitas sperma domba. [tesis]. [Bandung (Indonesia)]: Universitas Padjadjaran.
- Salisbury GW, Vandemark NL. 1985. Fisiologi dan reproduksi inseminasi buatan pada sapi. Penerjemah Djanuar R. Yogyakarta (Indonesia): Gajah Mada University Press.
- Sinha S, Deka BC, Tamulu MK, B.N. Borgohain BN. 1992. Effect of equilibration period and glycerol level in tris extender of quality of frozen goat semen. *Indian Vet J*. 69:1107-1110.
- Susilo T. 2005. Efisiensi reproduksi program inseminasi buatan terhadap sapi lokal pada daerah lahan basah dan kering di Kabupaten Magelang Provinsi Jawa Tengah. [Tesis]. [Semarang (Indonesia)]: Universitas Diponegoro.
- Steel RGD, Torrie. 1991. Prinsip dan prosedur statistika. Penerjemah: Sumantri B. Jakarta (Jakarta): PT Gramedia Pustaka Utama.
- Toelihere MR. 1993. Fisiologi reproduksi pada ternak. Bandung (Indonesia): Angkasa Bandung.