

# PERKEMBANGAN PENELITIAN TEKNIK KRIOPRESERVASI UNTUK PENYIMPANAN SEMEN UNGGAS

TATAN KOSTAMAN dan A.R. SETIOKO

Balai Penelitian Ternak, PO Box 221, Bogor 16002

(Makalah diterima 15 April 2011 – Revisi 25 Agustus 2011)

## ABSTRAK

Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen) dalam keadaan beku. Dalam hal ini, teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu yang sangat rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) dalam nitrogen cair. Pada suhu tersebut, semen hampir sama sekali tidak mengalami proses metabolisme namun masih memiliki kemampuan hidup pada saat digunakan nantinya. Semen yang disimpan dengan cara kriopreservasi mempunyai waktu penyimpanan yang tidak terbatas. Teknik kriopreservasi mempunyai keuntungan lebih efisien dari segi biaya, waktu, ruang penyimpanan, dan tenaga dibandingkan dengan teknik lain. Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik konvensional (pembekuan lambat terkontrol) dan teknik pembekuan cepat. Selain dengan kriopreservasi semen, material genetik lain dari unggas yang dapat di kriopreservasi adalah sel *Primordial Germ Cells* (PGC). Balitnak sudah berhasil mengisolasi sel PGC dari beberapa ayam lokal Indonesia. Keberhasilan teknik kriopreservasi tidak hanya ditunjukkan oleh kemampuan hidup pascakriopreservasi tetapi juga ditentukan oleh tingkat fertilitasnya.

**Kata kunci:** Unggas, penyimpanan, kriopreservasi, semen

## ABSTRACT

### RESEARCH DEVELOPMENT ON CRYOPRESERVATION TECHNIQUE TO PRESERVE AVIAN SEMEN

Cryopreservation technique could be used to preserve animal cell, plant or other genetic materials (included semen) in frozen. In this case, the cryopreservation technique is a storage technique that carries out at very low temperature in liquid nitrogen at  $-196^{\circ}\text{C}$ . At this temperature, semen does not experience the process of metabolism but still has the ability to live on when used later. Semen that is preserved by cryopreservation technique has unlimited shelf life. This method is more efficient in terms of cost, time, space, and labour than other methods. Cryopreservation techniques can be divided into conventional technique (controlled slow freezing) and rapid freezing technique. Besides cryopreservation of semen, other genetic material from avian that can be cryopreserved is Primordial Germ Cells (PGC). Balitnak has successfully isolated the PGC of some Indonesian native chickens. The success of cryopreservation is indicated by not only the high rate of survival, but also the fertility after cryopreservation.

**Key words:** Avian, storage, cryopreservation, semen

## PENDAHULUAN

Teknik kriopreservasi merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologis, biologis, dan morfologis tetap ada. Teknik kriopreservasi merupakan teknik penyimpanan yang dilakukan pada suhu yang sangat rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) dalam nitrogen cair (BOEDIONO, 2003). Teknik kriopreservasi juga sebagai faktor pendukung tambahan yang sangat baik untuk konservasi *in situ* dan mungkin juga digunakan dalam program seleksi (DANCHIN-BURGE dan HIEMSTRA, 2003). Sementara itu, menurut FULTON (2006) kriopreservasi plasma nutfah akan

menjadi alat yang sangat berharga bagi industri unggas dan untuk keberhasilan pelestarian sumber daya genetik unggas yang masih ada.

DUMPALA *et al.* (2006) menyatakan bahwa volume semen ayam sangat sedikit, sehingga penambahan volume sperma sebelum IB dan penyimpanan atau pembekuan sangat diperlukan dengan cara menambahkan pengencer semen yang cocok. Selain itu, langkah penting dalam keberhasilan kriopreservasi semen unggas adalah dengan pemilihan krioprotektan yang tepat dan metode *freezing-thawing* (SUIDZINSKA dan LUKASZEWICZ, 2008).

Pada dasarnya tujuan utama kriopreservasi semen ialah melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan dan mendukung program teknologi inseminasi buatan (IB) pada ternak.

Tujuan penulisan ini yaitu untuk mengulas lebih dalam tentang teknik kriopreservasi untuk penyimpanan semen unggas dan faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi keberhasilan kriopreservasi.

## TEKNIK KRIOPRESERVASI

Teknik kriopreservasi dapat dibedakan atas teknik kriopreservasi konvensional (*conventional slow freezing*) dan kriopreservasi secara cepat (*rapid freezing*). Teknik kriopreservasi konvensional adalah teknik kriopreservasi yang lebih menekankan pada proses pembekuan lambat. Pada teknik ini, suhu diturunkan secara bertahap dengan mesin pendingin yang dapat diprogram. Dengan teknik ini kristal es masih terbentuk, baik ekstraseluler maupun intraseluler, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Hal ini disebabkan oleh elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (WATSON, 2000).

Teknik ini selain melibatkan proses pemaparan krioprotektan baik pada saat pra-pembekuan dan pasca-*thawing* (pencairan kembali) yang bertahap, juga melibatkan proses pembekuan bertahap dengan menekankan pentingnya proses *seeding*. Proses *seeding* dimaksudkan untuk menginisiasi pembentukan kristal es sebagai inti es dengan menurunkan temperatur sebagian larutan, agar dehidrasi terjadi dan menekan pelepasan energi panas yang berlebihan dari fusi kristal es. Inisiasi secara mendadak ini dilakukan pada temperatur sedikit di bawah titik beku larutan, sehingga dapat mencegah membesarnya derajat *supercooling* atau memperpendek selang *supercooling*. Tanpa perlakuan *seeding*, inti es akan terbentuk secara spontan pada temperatur  $-10^{\circ}\text{C}$  sampai  $-15^{\circ}\text{C}$  (fenomena *supercooling*) yang disertai dengan pelepasan fusi panas, sehingga temperatur hampir mencapai titik bekunya kembali. Kondisi ini akan menimbulkan suatu fluktuasi temperatur yang cukup besar.

Teknik kriopreservasi konvensional juga disebut dengan teknik pembekuan dua tahap. Teknik pembekuan dua tahap meliputi inkubasi sel dalam krioprotektan dengan total konsentrasi 1-2 M yang menyebabkan dehidrasi moderat dan diikuti oleh pembekuan lambat, misalnya dengan kecepatan  $1^{\circ}\text{C}/\text{menit}$  hingga suhu  $-35^{\circ}\text{C}$ , lalu pembekuan dalam nitrogen cair dan *thawing* untuk evaluasi.

Teknik kriopreservasi cepat adalah proses pemadatan konsentrasi krioprotektan (ekstraseluler maupun intraseluler). Pada teknik ini, sebagian besar

air di dalam sel dikeluarkan sebelum terjadi pembekuan intraseluler dan digantikan dengan krioprotektan, sehingga pada saat pembekuan tidak terjadi kristal es (VALERDI *et al.*, 2009). Prosesnya meliputi (a) dehidrasi, yaitu proses pergantian cairan sitoplasma dengan larutan krioprotektan melalui proses difusi ke dalam sel; (b) pembekuan, tahapan pada saat sel atau organ dan larutan berada dalam nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) membentuk padatan *solid glass*; (c) *warming*, yaitu tahap terjadinya perubahan kembali bentuk padatan menjadi cair; serta (d) rehidrasi, yaitu proses masuknya kembali air ke dalam sel untuk menggantikan kedudukan krioprotektan.

Setiap teknik kriopreservasi mempunyai kelebihan dan kekurangan. Kelebihan dari kriopreservasi secara umum adalah (1) bahan atau materi dapat disimpan dalam waktu tidak terbatas; (2) dapat dikoleksi setiap saat; (3) dapat digunakan kapan saja bila dibutuhkan; (4) melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan; (5) tidak perlu mengimpor atau memelihara pejantan-pejantan unggul; (6) tidak membutuhkan ruangan yang besar karena tabung nitrogen cair cukup memadai untuk menyimpan bahan dalam ragam dan jumlah yang banyak; dan (7) tidak menyebabkan perubahan material genetik yang disimpan. Sementara itu, kekurangannya adalah (1) biaya pelaksanaan cukup mahal; (2) memerlukan tenaga yang terampil dan berpengalaman; (3) nitrogen cair perlu tersedia secara kontinyu; dan (4) hanya semen yang berkualitas baik yang dapat dan layak dibekukan (TOELIHERE, 1985).

## FAKTOR YANG MEMPENGARUHI KEBERHASILAN KRIOPRESERVASI

Sejumlah faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik kriopreservasi konvensional adalah (1) kecepatan pembekuan; (2) jenis dan konsentrasi krioprotektan; (3) suhu akhir pembekuan; dan (4) tipe dan keadaan fisiologis bahan yang akan disimpan. Jika pembekuan terlalu lambat maka air akan banyak keluar dari sel untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi air intraseluler dan ekstraseluler serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraseluler. Apabila media pengencer didinginkan di bawah tingkat pendinginan maka kristal es menggumpal dan air akan mengalami pengkristalan keluar sebagai es (WATSON, 2000). Jika pembekuan terlalu cepat maka keseimbangan potensial air akan terganggu dan air intraseluler akan membeku. Pada derajat penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang halus di dalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar. Kondisi ini akan mengakibatkan kerusakan dan kematian sel (PARKS dan GRAHAM, 1992).

Penambahan krioprotektan bertujuan untuk memelihara keutuhan membran dan meningkatkan potensial osmotik media sehingga cairan di dalam sel mengalir keluar dan terjadi dehidrasi. Kemampuan proteksi krioprotektan terhadap membran sel merupakan indikasi dari interaksi yang berjalan baik antara krioprotektan dan membran sel. Interaksi ini dapat mengurangi kerusakan membran sel pada saat terjadi perubahan keadaan dari relatif cair ke struktur relatif padat dan juga pada saat kembali ke struktur yang relatif cair selama proses pencairan.

Krioprotektan ialah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan. Berdasarkan cara kerjanya krioprotektan dikelompokkan mejadi *penetrating* (bekerja di dalam dan di luar sel), seperti etilen glikol dan propilen glikol (CHEN *et al.*, 2005, LUZ *et al.*, 2009) dan *non-penetrating* (hanya di luar sel), seperti sukrosa, glukosa, atau fruktosa (DIEZ *et al.*, 2001, BARCELO-FIMBRES dan SEIDEL, 2007). Sementara itu, berdasarkan bahan yang terkandung di dalamnya krioprotektan dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu kelompok alkohol (etilen glikol, gliserol, dan lain-lain) dan kelompok amida (dimetilformamid, asetamid, metilformamid, dan lain-lain) (ALVARENGA *et al.*, 2005).

Dasar pemilihan jenis krioprotektan untuk pembekuan semen menurut SQUIRES *et al.* (2004) dan ALVARENGA *et al.* (2005) selain mengandung bahan yang bekerja melindungi sel pada saat pembekuan juga harus mempunyai bobot molekul yang kecil agar lebih mudah dan cepat penetrasi ke dalam sel, sehingga mengurangi toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi; dan mudah larut dalam air. Pengaruh krioprotektan dalam melindungi spermatozoa pada saat kriopreservasi selain dari cara kerjanya, juga dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasinya. Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen unggas adalah *dimethylsulfoxide* (DMSO), *dimethylformamide* (DMF), *dimethylacetamide* (DMA), dan gliserol (TSELUTIN *et al.*, 1999; BLANCO *et al.*, 2000; SETIOKO *et al.*, 2001; 2002; KUSUMANINGRUM *et al.*, 2002; SONTAKKE *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2005; ISKANDAR *et al.*, 2006; BLESBOIS *et al.*, 2007; SOPIYANA *et al.*, 2007; MAKHAFOLA *et al.*, 2009; PURDY *et al.*, 2009; GERZILOV, 2010).

DMSO adalah campuran organosulfur dengan rumus kimia  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  dan mempunyai berat molekul sebesar 78,13. DMSO adalah suatu bahan pelarut polar aprotik yang penting. DMSO juga dikenal sebagai krioprotektan konvensional yang ditambahkan ke media sel untuk mencegah kematian sel sepanjang proses pembekuan. Titik beku DMSO tinggi, pada suhu kamar merupakan suatu padatan yang dapat membatasi

kegunaannya dalam beberapa proses kimia (seperti kristalisasi pada waktu *cooling*). Dosis DMSO dalam pengencer semen bervariasi di antara jenis ternak. Dosis optimum DMSO dalam pengencer semen itik sebesar 10% (HAN *et al.*, 2005), ayam *White Leghorn*, *Ovambo*, dan *Potchefstroom Koekoek* sebesar 5% (MAKHAFOLA *et al.*, 2009).

Krioprotektan DMF mempunyai berat molekul 73,10 dengan berat jenis  $0,95 \text{ g/cm}^3$  dan sangat stabil pada larutan yang bebas asam-basa serta sangat mudah larut dalam air. Dosis optimum DMF dalam pengencer semen itik sebesar 8% (HAN *et al.*, 2005) dan ayam Kampung sebesar 5 – 7% (SOPIYANA *et al.*, 2007).

Krioprotektan DMA merupakan senyawa dengan berat molekul 87,12 dan berat jenis  $0,94 \text{ g/cm}^3$  merupakan larutan yang mudah larut dalam air, alkohol, ether, aseton, benzena dan larutan lain, mempunyai kemampuan penetrasi yang baik pada sel-sel dengan kandungan *lipid* membran yang banyak. Dosis optimum DMA dalam pengencer semen itik sebesar 10% (HAN *et al.*, 2005), entog sebesar 7% (KUSUMANINGRUM *et al.*, 2002) dan ayam Arab sebesar 7% (ISKANDAR *et al.*, 2006).

Gliserol mampu mengikat air yang cukup kuat karena adanya tiga gugus hidroksil yang dimilikinya. Gliserol dapat menggantikan sebagian air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit sehingga menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya rusaknya terhadap spermatozoa dengan jalan memodifikasi kristal es yang terbentuk (TOELIHERE, 1985). Di dalam membran plasma, krioprotektan ini akan mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga mengatasi ketidakstabilan membran serta berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein sehingga menyebabkan partikel-partikel intramembran terkumpul (PARK dan GRAHAM, 1992). Dosis optimum gliserol dalam pengencer itik sebesar 8% (HAN *et al.*, 2005) dan ayam Kampung sebesar 5 – 7% (SOPIYANA *et al.*, 2007).

Pada teknik kriopreservasi cepat, faktor yang menentukan keberhasilan kriopreservasi tergantung pada teknik yang diterapkan. Prosedur kriopreservasi cepat memberikan pendekatan yang sederhana, ekonomis dan pemanfaatan waktu terhadap proses pembekuan dibandingkan dengan prosedur kriopreservasi konvensional (CSEH *et al.*, 1997). Menurut VALERDI *et al.* (2009) bahwa teknik kriopreservasi cepat adalah teknik yang efisien untuk kriopreservasi dengan memberikan *survival rate* yang tinggi.

## PENGUJIAN KUALITAS SEMEN UNGGAS PASCAKRIOPRESERVASI

Keberhasilan pembekuan semen secara *in vitro*, dapat dilihat dari jumlah spermatozoa yang berhasil

pulih dari proses pembekuan yang disebut dengan *recovery rate*. Berbagai teknik telah dikembangkan untuk melihat persentase spermatozoa motil secara subjektif ataupun menggunakan bantuan *computerized assisted sperm analyzed* (CASA). CASA mulai digunakan sejak tahun 1990-an. Evaluasi menggunakan CASA selain dapat mengetahui persentase total spermatozoa motil dan progresif juga memberikan informasi karakteristik spermatozoa motil yang lengkap, seperti *dance average path velocity* (DAP), *dance curvilinear velocity* (DCL), *dance straight line velocity* (DSL), *average path velocity* (VAP), *curvilinear velocity* (VCL), *straight line velocity* (VSL), *straightness* (STR), *linearity* (LIN), *wobble* (WOB), *amplitude lateral head displacement* (ALH), dan *beat cross frequency* (BCF). Dari ke-13 karakteristik motilitas spermatozoa tersebut yang paling sering dilaporkan adalah total motil, progresif motil dan VCL. Contoh hasil evaluasi kualitas semen beku ayam dengan menggunakan CASA seperti pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Perbandingan semen beku ayam yang diamati pada tahun 1985 dan 2005 dengan menggunakan CASA

Tahun	Jumlah	Motilitas (%)	<i>Straightness</i> (%)	<i>Path Velocity</i> ( $\mu\text{m/s}$ )
1985	10	24,6	73,3	45,0
2005	12	15,3	76,0	37,2

**Sumber:** BLACKBURN (2006)

Selain dengan alat bantu, evaluasi kualitas semen sebelum dilakukan inseminasi merupakan ukuran kualitas yang sebenarnya dan memberikan gambaran tingkat fertilitas yang akan dicapai. Namun demikian banyak faktor yang mempengaruhi tingkat fertilitas sperma beku-*thawing*, di antaranya adalah jenis krioprotektan (DONOGHUE dan WISHART, 2000), tingkat sensitivitas terhadap proses beku-*thawing* disamping fungsi sistem transportasi dan penyimpanan dalam saluran reproduksi betina (BAKS *et al.*, 1994). Hasil pengujian fertilitas dari beberapa semen beku unggas disajikan pada Tabel 2.

Selain dilihat dari fertilitas, ada prosedur lain yang digunakan untuk memprediksi keberhasilan kriopreservasi dari semen ayam, yaitu dengan melihat keadaan membrannya (BLESBOIS *et al.*, 2008). Setiap spermatozoa harus memiliki membran plasma utuh karena tidak lepas dari peranannya sebagai alat transportasi keluar masuknya zat-zat makanan dan ion-ion yang diperlukan untuk proses metabolisme. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan ekor melingkar atau menggebu, karena proses transportasi air ke dalam sel berlangsung

baik. Sebaliknya bila membran plasma rusak akan ditandai dengan ekor sperma tetap lurus bila dipaparkan dalam larutan hipoosmotik, karena proses transportasi air ke dalam sel sudah rusak.

**Tabel 2.** Persentase fertilitas dari beberapa ternak unggas yang di inseminasi dengan semen beku

Jenis ternak	% fertilitas	Sumber
Kalkun	30,0 – 61,0	SEXTON (1981) BLESBOIS (2007)
Angsa	68,0 – 95,0	LUKASZEWICZ (2001)
Entog	32,3	SETIOKO <i>et al.</i> (2002)
Itik Alabio	67,3	SETIOKO <i>et al.</i> (2002)
Itik Jinding	39,0	HAN <i>et al.</i> (2005)
Ayam	30,4 – 60,0	BLESBOIS <i>et al.</i> (2007) PURDY <i>et al.</i> (2009)
Unggas	26,7 – 92,7	TSELUTIN <i>et al.</i> (1999)
Merpati	45,0	SONTAKKE <i>et al.</i> (2004)

## PERKEMBANGAN PENELITIAN KRIOPRESERVASI

Kriopreservasi semen unggas telah dipelajari lebih dari 50 tahun dan dewasa ini sudah berkembang, baik dalam penelitian maupun bank gen. Khusus untuk kriopreservasi semen unggas air telah dilakukan di beberapa negara seperti Taiwan, Perancis, Jepang, Cina dan beberapa negara di Eropa Timur. Di Balai Penelitian Ternak (Balitnak), penelitian kriopreservasi telah diterapkan pada ternak unggas khususnya entog, itik dan ayam tetapi dengan hasil yang masih bervariasi (Tabel 3).

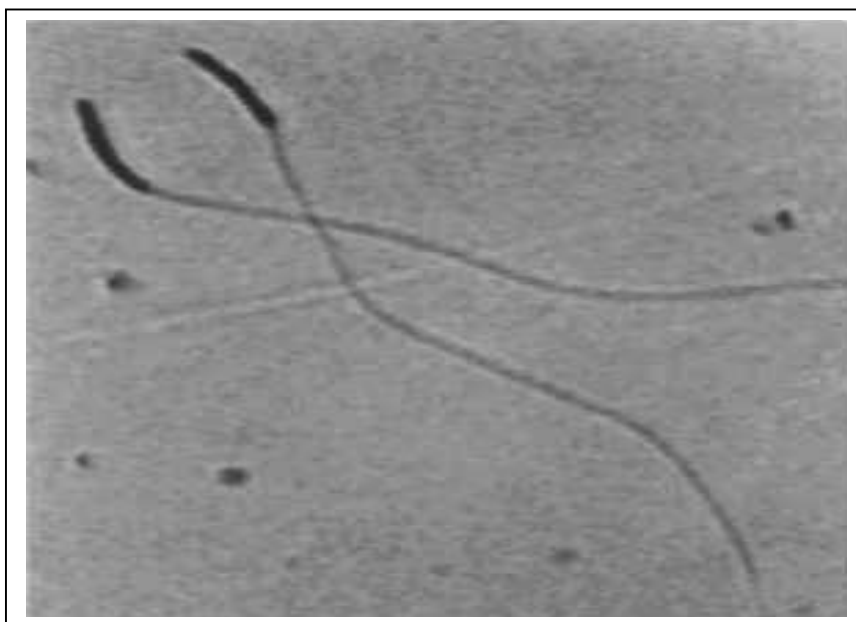
Kesulitan yang menyebabkan bervariasinya hasil yang diperoleh pada tingkat laboratorium ini, dikarenakan oleh spermatozoa yang mudah rusak. Bentuk kepala spermatozoa unggas seperti sabit sehingga menyebabkan bagian leher mudah patah dalam proses penyimpanan. Selain itu, ekor spermatozoa unggas panjangnya delapan kali panjang dari kepalanya (90 – 100  $\mu\text{m}$ ) (THURSTON dan HESS, 1987), sebagai perbandingan panjang ekor spermatozoa sapi hanya lima kali panjang dari kepalanya (SALISBURY dan VANDEMARK, 1985) (Gambar 1).

Untuk menanggulangi permasalahan tersebut saat ini, sedang dicoba penelitian kriopreservasi yang berasal dari *Primordial Germ Cells* (PGC) ayam lokal dengan metode *nicodenz density gradient centrifugation*. Hasil sementara pada tahun 2008 telah berhasil mengumpulkan sel PGC pada ayam lokal, dengan rata-rata sekitar 28,6 sel PGC per embrio (SOPIYANA *et al.*, 2008; SETIOKO *et al.*, 2010). Sementara itu, kegiatan pembekuan sel PGC masih terus berlangsung.

**Tabel 3.** Persentase motilitas semen beku dari beberapa jenis ternak unggas

Krioprotektan	Konsentrasi (%)	Jenis ternak										
		Itik Jinding	Entok	Itik	Ayam Arab	Ayam Kampung	Angsa	Ayam White Leghorn	Ayam Ovambo	Ayam Potchefstroom Koekoek	Merpati	Itik Muscovy
Gliserol	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35,33 <sup>11</sup>
	7	-	-	-	-	33,13 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-
	8	54 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO	5	-	-	-	-	-	-	20 <sup>9</sup>	35 <sup>9</sup>	30 <sup>9</sup>	-	-
	7	-	38,30 <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	25,00 <sup>11</sup>
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39,2 <sup>10</sup>	-
	10	58 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMA	7	-	35,13 <sup>5</sup>	-	34,53 <sup>6</sup>	33,75 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-
	9	-	46,52 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	49 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMF	6	-	-	-	-	-	40 <sup>8</sup>	-	-	-	-	-
	7	-	46,42 <sup>3</sup>	32,86 <sup>3</sup>	-	32,50 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-	-
	8	46 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	50,08 <sup>4</sup>	-	30,0 <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-

**Sumber:** <sup>1</sup>HAN *et al.* (2005); <sup>2</sup>SETIOKO *et al.* (2001); <sup>3</sup>SETIOKO *et al.* (2002); <sup>4</sup>KUSUMANINGRUM *et al.* (2002); <sup>5</sup>GAZALI (2001); <sup>6</sup>ISKANDAR *et al.* (2006); <sup>7</sup>SOPİYANA *et al.* (2007); <sup>8</sup>LUKASZEWICS (2001); <sup>9</sup>MAKHAFOLA *et al.* (2009); <sup>10</sup>SONTAKKE *et al.* (2004); <sup>11</sup>GERZILOV (2010)



**Gambar 1.** Bentuk morfologi spermatozoa unggas yang normal (pembesaran 400x)

**Sumber:** SONTAKKE *et al.* (2004)

## KESIMPULAN

Teknik kriopreservasi merupakan teknik yang potensial untuk penyimpanan jangka panjang, yaitu menyimpan material genetik ke dalam nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) dalam keadaan beku. Dengan demikian dapat dimanfaatkan setiap saat bila dibutuhkan dan digunakan dalam mendukung penerapan teknologi inseminasi buatan pada ternak. Penyimpanan dengan cara kriopreservasi mempunyai keuntungan, yaitu lebih efisien dari segi biaya, waktu, ruang penyimpanan, dan tenaga. Balitnak sejak tahun 2008 telah berhasil mengisolasi sel PGC dari beberapa ayam lokal Indonesia dan diharapkan dapat memberikan hasil yang lebih baik daripada pembekuan semen-nya. Keberhasilan teknik kriopreservasi tidak hanya ditunjukkan dengan kemampuan hidup dari material genetik pascakriopreservasi, namun juga ditentukan oleh tingkat fertilitasnya.

## DAFTAR PUSTAKA

- ALVARENGA, M.A., F.O. PAPA, F.C. LANDIM-ALVARENGA and A.S.L. MEDEIROS. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A. *Review Anim. Reprod. Sci.* 89: 105 – 113.
- BAKS, M.R., G.J. WISHART and J.B. BRILLARD. 1994. Oviduct sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5: 117 – 13.
- BARCELO-FIMBRES, M. and G.E. SEIDEL Jr. 2007. Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Molecular Reprod. Develop.* 74: 1395 – 1405.
- BLACKBURN, H.D. 2006. The national animal germplasm program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult. Sci.* 85: 210 – 215.
- BLANCO, J.M., G. GEE, D.E. WILDT and A.M. DONOGHUE. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol. Reprod.* 63: 1164 – 1171.
- BLESBOIS, E., I. GRASSEAU, F. SEIGNEURIN, S. MIGNON-GRASTEAU, M. SAINT JALME and M.M. MIALON-RICHARD. 2008. Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology* 69: 252 – 261.
- BLESBOIS, E., F. SEIGNEURIN, I. GRASSEAU, C. LIMOUZIN, J. BESNARD, D. GOURICHON, G. COQUERELLE, P. RAULT and M. TIXIER-BOICHARD. 2007. Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: Creation of the French avian cryobank. *Poult. Sci.* 86: 555 – 564.
- BOEDIONO, A. 2003. Vitriifikasi vs pembekuan lambat pada pembekuan embrio. *Symposium Perkumpulan Teknologi Reproduksi Indonesia (PATRI)*. Denpasar. hlm. 24 – 32.

- CHEN, S.U., Y.R. LIEN, H.F. CHEN, L.J. CHANG, Y.Y. TSAI and Y.S. YANG. 2005. Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI. *Human Reprod.* 20: 1975 – 1980.
- CSEH, S., J. CORSELLI, S.L. NEHLSSEN-CANNARELLA, L.L. BAILEY and SZALAY. 1997. The effect of quick-freezing in ethylene glycol on morphological survival and *in vitro* development of mouse embryos frozen at different preimplantation stages. *Theriogenology* 48: 43 – 50.
- DANCHIN-BURGE, C. and S.J. HIEMSTRA. 2003. Cryopreservation of domestic animal species in France and Netherlands: Experience, similarities and differences. *Workshop on Cryopreservation of Animal Genetic Resources in Europe* pp. 15 – 28.
- DIEZ C., Y. HEYMAN, D. LE BOURHIS, C. GUYADER-JOLY, J. DEGROUARD and J.P. RENARD. 2001. Delipidating *in vitro*-produced bovine zygotes: Effect on further development and consequences for freezability. *Theriogenology* 55: 923 – 936.
- DONOGHUE, A.M. and G.J. WISHART. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213 – 232.
- DUMPALA, P.R., H.M. PARKER and C.D. MC DANIEL. 2006. The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. *Int. J. Poult. Sci.* 5: 838 – 845.
- FULTON, J.E. 2006. Avian genetic stock preservation: An industry perspective. *Poult. Sci.* 85: 227 – 231.
- GAZALI, M. 2001. Kriopreservasi Semen Entog Dalam Upaya Produksi Itik Serati Menggunakan Teknologi Inseminasi Buatan. Tesis. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. 72 hlm.
- GERZILOV, V. 2010. Influence of various cryoprotectants on the sperm mobility of Muscovy semen before and after cryopreservation. *Agric. Sci. Technol.* 2: 57 – 60.
- HAN, X.F., Z.Y. NIU, F.Z. LIU and C.S. YANG. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 197 – 201.
- ISKANDAR, S., R. MARDALESTARI, R. HERNAWATI, E. MARDIAH dan E. WAHYU. 2006. Pengaruh jenis, konsentrasi krioprotektan dan metode *thawing* terhadap kualitas semen beku ayam Arab. *JITV* 11: 34 – 38.
- KUSUMANINGRUM, D.A., P. SITUMORANG, A.R. SETIOKO, T. SUGIARTI, E. TRIWULANNINGSIH dan R.S.G. SIANTURI. 2002. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap daya hidup spermatozoa entog. *JITV* 7: 244 – 250.
- LUKASZEWICS, E. 2001. Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. *Theriogenology* 55: 1819 – 1829.
- LUZ, M.R., C.C. HOLANDA, J.J. PEREIRA, N.S. TEIXEIRA, R. VANTINI, P.M.C. FREITAS, A.E.P. SALGADO, S.B. OLIVEIRA, C.R.F. GUAITOLINI and M.C. SANTOS. 2009. Survival rate and *in vitro* development of *in vivo*-produced and cryopreserved dog embryos. *Reprod. Fertil. Develop.* 22: 208 – 209 (abstract).
- MAKHAFOLA, M.B., K.C. LEHLOENYA, M.L. MPHAPHATHI, A. DINNYES and T.L. NEDAMBALE. 2009. The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African J. Anim. Sci.* 39: 242 – 245.
- PARKS, J.E. and J.K. GRAHAM. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209 – 222.
- PURDY, P.H., Y. SONG, F.G. SILVERSIDES and H.D. BLACKBURN. 2009. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poult. Sci.* 88: 2184 – 2191.
- SALISBURY, G.W. dan N.L. VANDEMARK. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 869 hlm.
- SETIOKO, A.R., P. SITUMORANG, D.A. KUSUMANINGRUM, T. SUGIARTI dan E. TRIWULANNINGSIH. 2001. Pengaruh krioprotektan terhadap kualitas spermatozoa entog dan penurunan kualitasnya selama proses pembekuan. *Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor*, 17 – 18 September 2001. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 546 – 552.
- SETIOKO, A.R., P. SITUMORANG, E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI dan D.A. KUSUMANINGRUM. 2002. Pengaruh krioprotektan dan waktu ekulibrasi terhadap kualitas dan fertilitas spermatozoa itik dan entog. *JITV* 7: 237 – 243.
- SETIOKO, A.R., T. KOSTAMAN dan S. SOPIYANA. 2010. Jumlah *primordial germ cells* (PGC) pada beberapa tingkat umur embrio yang berbeda pada ayam buras dan ras. *Pros. Seminar Nasional Biologi. Jatiningor, Bandung* 6 Desember 2010. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Padjajaran. Bandung. hlm. 133 – 141.
- SEXTON, T.J. 1981. Development of a commercial method for freezing turkeys semen. 1. effect of prefreeze techniques on the fertility of processed unfrozen and frozen-thawed semen. *Poult. Sci.* 60: 1567 – 1573.
- SONTAKKE, S.D., G. UMAPATHY, V. SIVARAM, S.D. KHOLKUTE and S. SHIVAJI. 2004. Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the blue rock pigeon (*Columba livia*). *Theriogenology* 62: 139 – 153.
- SOPIYANA, S., S. ISKANDAR, T. SUSANTI dan D. YOGASWARA. 2007. Pengaruh krioprotektan DMA, DMF dan glycerol pada proses pembekuan semen ayam Kampung. *Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor*, 5 – 6 September 2006. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 702 – 708.

- SOPIYANA, S., T. KOSTAMAN dan A.R. SETIOKO. 2008. Pemurnian *primordial germ cells* (PGCs) ayam lokal dengan metode *nicodenz density gradient centrifugation* (NGC). Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 11 – 12 Nopember 2008. Puslitbang Peternakan, Bogor. hlm. 576 – 581.
- SQUIRES, E.L., S.L. KEITH and J.K. GRAHAM. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1056 – 1065.
- SUIDZINSKA, A. and E. LUKASZEWICZ. 2008. The effect of breed on freezability of semen of fancy fowl. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 26: 331 – 340.
- THURSTON, R.J. and B.L. HESS. 1987. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: comparative study of turkey, chicken, and guinea fowl. *Scanning Microscope* 1: 1829 – 1838.
- TOELIHERE, M R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- TSELUTIN, K., F. SEIGNEURIN and E. BLESBOIS. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poult. Sci.* 78: 586 – 590.
- VALERDI, M.R., P. EFTEKHARI-YAZDI, L. KARIMIAN, F. HASSANI and B. MOVAGHAR. 2009. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 26: 347 – 354.
- WATSON, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60 – 61: 481 – 492.