

# Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Sapi Bali yang Dipreservasi pada Suhu 3–5°C dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang Berbeda

MUHAMMAD RIZAL

*Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura  
Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon 97233  
Email: icang65@yahoo.com*

(Diterima dewan redaksi 13 Januari 2009)

## ABSTRACT

RIZAL, M. 2009. Viability of Bali bull epididymal spermatozoa preserved at 3–5°C in Tris extender with different lactose concentrations. *JITV* 14(2): 142-149.

Cauda epididymal spermatozoa could be used as an alternative source of gamete in the application of various reproductive technologies, because the spermatozoa is motile and has ability for fertilizing the oocyte. The objective of this research was to examine the effectivity of lactose in maintaining viability of Bali bull epididymal spermatozoa preserved at 3–5°C. Five testis with epididymides of Bali bulls were obtained from slaughterhouse. Epididymal spermatozoa was collected by the combination of slicing, flushing and tissues pressure of cauda epididymides with physiological saline (0.9% NaCl). Collected-spermatozoa was divided in equal volume into three tubes and diluted with Tris extender containing 20% egg yolk (control), Tris extender + 0.3 g lactose/100 ml (L0.3), and Tris extender + 0.6 g lactose/100 ml (L0.6), respectively. Diluted-spermatozoa was stored in refrigerator at 3–5°C. Quality of diluted-spermatozoa including percentages of motile spermatozoa (MS), live spermatozoa (LS), and intact plasma membrane (IPM) were evaluated every day during storage at 3–5°C for six days. Data were analyzed using completely randomized design with three treatments and five replications. Results of this study showed that mean spermatozoa concentration, percentage of MS, percentage of LS, percentage of abnormal spermatozoa, percentage of cytoplasmic droplet, and percentage of IPM of Bali bull fresh epididymal spermatozoa were 11,222.5 million cell/ml, 75, 86.75, 10.5, 14, and 86.75%, respectively. At day-7 storage, percentages of MS, LS, and IPM for L0.3 (39, 50.6, and 51.6%) and L0.6 (39, 51.4, and 51.8%) were significantly ( $P<0.05$ ) higher than control (29, 41.8, and 42.4%). In conclusion, addition of lactose in Tris extender extended viability of Bali bull epididymal spermatozoa preserved at 3–5°C.

**Key Words:** Lactose, Preservation, Epididymal Spermatozoa, Bali Bull

## ABSTRAK

RIZAL, M. 2009. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3–5°C dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *JITV* 14(2): 142-149.

Spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif sumber gamet dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi, karena spermatozoa tersebut telah motil dan memiliki kemampuan membuahi oosit. Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas penambahan laktosa dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3–5°C. Sebanyak lima buah testis beserta epididimis sapi Bali diperoleh dari rumah pematangan hewan. Spermatozoa epididimis dikoleksi dengan metode kombinasi *slicing*, *flushing*, dan penekanan cauda epididimis dengan larutan NaCl fisiologis (0,9% NaCl). Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan pengencer Tris yang mengandung 20% kuning telur (kontrol), pengencer Tris + 0,3 g laktosa/100 ml (L0,3), dan pengencer Tris + 0,6 g laktosa/100 ml (L0,6). Spermatozoa yang telah diencerkan disimpan di dalam lemari es pada suhu 3–5°C. Kualitas spermatozoa meliputi persentase spermatozoa motil (SM), spermatozoa hidup (SH), dan membran plasma utuh (MPU) dievaluasi setiap hari selama enam hari. Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi spermatozoa, persentase SM, persentase SH, persentase spermatozoa abnormal, persentase butiran sitoplasma, dan persentase MPU spermatozoa segar epididimis sapi Bali adalah masing-masing 11.222,5 juta sel/ml, 75; 86,75; 10,5; 14; dan 86,75%. Pada hari ketujuh preservasi, persentase SM, SH, dan MPU pada L0,3 (40; 50,6; dan 51,6%) dan L0,6 (40; 51,4; dan 51,8%) nyata ( $P<0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (29; 41,8; dan 42,4%). Dapat disimpulkan bahwa penambahan laktosa di dalam pengencer Tris mampu memperpanjang daya hidup spermatozoa epididimis sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3–5°C.

**Kata Kunci:** Laktosa, Preservasi, Spermatozoa Epididimis, Sapi Bali

## PENDAHULUAN

Sapi Bali merupakan salah satu plasma nutfah asli Indonesia yang memiliki produktivitas cukup baik, sehingga berpotensi untuk dikembangkan menjadi suatu peternakan komersial. Peningkatan produktivitas sapi Bali dapat dipercepat dengan penerapan berbagai teknologi di bidang peternakan yang telah berkembang dengan pesat, mulai dari teknologi pakan hingga reproduksi. Khusus untuk teknologi reproduksi, pada saat ini, inseminasi buatan (IB) merupakan teknologi yang tepat untuk diterapkan pada peternakan. Inseminasi buatan merupakan teknologi yang dapat mengatasi keterbatasan jumlah pejantan unggul, serta kapasitas reproduksi pejantan dapat dimanfaatkan secara maksimal.

Selama ini dalam aplikasi teknologi IB umumnya spermatozoa yang dimanfaatkan adalah merupakan hasil ejakulasi yang ditampung dengan vagina buatan. Alternatif lain yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber spermatozoa, yaitu spermatozoa asal cauda epididimis. Cauda epididimis merupakan tempat penyimpanan spermatozoa sebelum diejakulasikan (TOELIHERE, 1981). Spermatozoa yang terdapat pada cauda epididimis merupakan spermatozoa yang sudah matang karena telah mengalami proses pematangan pada bagian caput dan corpus (TOELIHERE, 1981; HAFEZ dan HAFEZ, 2000). Menurut RIZAL (2005) upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis dalam bentuk semen cair atau semen beku untuk keperluan aplikasi berbagai teknologi reproduksi, menjadi metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang memiliki kualitas genetik unggul tetapi tidak dapat ditampung semennya. Selanjutnya dinyatakan bahwa metode ini juga menjadi alternatif dalam upaya penyelamatan plasma nutfah ternak atau hewan jantan yang mati secara mendadak serta hewan-hewan langka dan buas. Pada beberapa spesies hewan dan ternak, upaya penyelamatan material genetik yang berasal dari epididimis melalui pengolahan spermatozoa (cair dan beku) serta aplikasi IB dan fertilisasi *in vitro* (FIV) sudah banyak dilakukan dengan hasil yang cukup menjanjikan, di antaranya pada monyet (TOLLNER *et al.*, 1990; SANKAI *et al.*, 1994; FERADIS *et al.*, 2001), domba (GRAHAM, 1994; RIZAL, 2005), sapi (GRAHAM, 1994), badak (LUBBE *et al.*, 1999), babi (KIKUCHI *et al.*, 1998), beruang (ANEL *et al.*, 1999), kuda (SQUIRES *et al.*, 2000), lama dan alpaca (BRAVO *et al.*, 2000), rusa (GARDE *et al.*, 2000; SOLER *et al.*, 2003), kerbau Afrika (HEROLD *et al.*, 2004; HEROLD *et al.*, 2006), dan kerbau belang (RIZAL *et al.*, 2007; HERDIS *et al.*, 2008).

Menurut WHITE (1993) dalam proses preservasi semen pada suhu rendah (umumnya pada suhu 3–5°C dan -196°C) kerusakan spermatozoa akan terjadi akibat adanya pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membran plasma sel dan berakibat

kematian spermatozoa. Untuk meminimalkan kerusakan sel akibat pengaruh buruk suhu rendah, maka upaya yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan zat tertentu ke dalam pengencer semen (KAYSER *et al.*, 1992). Zat tersebut dikenal dengan nama krioprotektan seperti gliserol (krioprotektan intraseluler) dan beberapa jenis gula (krioprotektan ekstraseluler) (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992) yang dapat digunakan dalam proses kriopreservasi dan preservasi semen pada suhu 3–5°C. Di samping berperan sebagai senyawa krioprotektan, gula juga dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai substrat sumber energi.

Peranan penting gula dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses preservasi dan kriopreservasi semen berbagai jenis hewan dan ternak telah dilaporkan oleh beberapa peneliti dengan hasil yang baik. Beberapa jenis gula yang sering dimanfaatkan adalah: glukosa pada semen beku domba (MOLINIA *et al.*, 1993) dan semen beku babi (DE LOS REYES *et al.*, 2000); rafinosa pada semen beku kambing peranakan Etawah (SUWARSO, 1999); trehalosa pada semen beku domba Pampinta (AISEN *et al.*, 2000, 2002), dan semen beku domba Garut (HERDIS *et al.*, 2005); sukrosa dan trehalosa pada semen beku sapi (WOELDERS *et al.*, 1997); laktosa pada semen beku kambing (SINGH *et al.*, 1995), semen beku domba Garut (RIZAL, 2005), dan semen cair domba Garut (RIZAL, 2006); maltosa pada semen beku domba Garut (HERDIS, 2005); serta dextrosa, trehalosa, rafinosa, dan sukrosa pada semen beku domba Garut (RIZAL *et al.*, 2006).

Pada penelitian ini dilakukan penambahan laktosa ke dalam pengencer Tris untuk mempreservasi spermatozoa yang dikoleksi dari cauda epididimis sapi Bali pada suhu 3–5°C. Diharapkan dengan penambahan laktosa akan meminimalkan kerusakan spermatozoa selama preservasi, sehingga daya tahan hidupnya dapat diperpanjang.

## MATERI DAN METODE

### Koleksi dan pengolahan spermatozoa

Testis beserta epididimis sapi Bali sebanyak lima buah (sebagai jumlah ulangan) diperoleh dari rumah pematangan hewan (RPH) di Mardika, Ambon. Testis beserta epididimis dikumpulkan pada saat pematangan sapi sekitar jam 12 malam, kemudian ditranspor ke Laboratorium Produksi Ternak, Jurusan Peternakan, Universitas Pattimura. Selanjutnya spermatozoa dikoleksi sekitar jam 07.00 pagi. Epididimis dipisahkan dari testis dan dibilas dengan larutan NaCl fisiologis (0,9% NaCl). Spermatozoa dikoleksi dengan kombinasi teknik *slicing*, pembilasan, dan penekanan (bilas-tekan) pada setiap jaringan cauda epididimis (RIZAL, 2005) menggunakan larutan NaCl fisiologis. Sebelum dibilas-tekan dengan larutan NaCl fisiologis, spermatozoa

disedot dengan pipet eritrosit untuk dihitung konsentrasinya.

Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dengan volume yang sama. Spermatozoa diencerkan dengan pengencer sesuai perlakuan, yakni: 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur (kontrol), 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur + 0,3 g laktosa per 100 ml pengencer (L0,3), dan 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur + 0,6 g laktosa per 100 ml pengencer (L0,6). Komposisi pengencer dasar Tris terdiri atas: 3,87 g Tris (hidroksimetil) aminometan, 2,17 g asam sitrat, dan 1,56 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml, kemudian ditambahkan penisilin dan streptomisin masing-masing sebanyak 1.000 IU per mililiter pengencer. Spermatozoa diencerkan hingga mencapai konsentrasi 15 juta spermatozoa motil per mililiter. Selanjutnya tabung reaksi ditutup rapat kemudian dimasukkan ke gelas piala yang berisi air bersih dan dipreservasi di dalam lemari es (*refrigerator*) yang bersuhu sekitar 3–5°C. Contoh masing-masing perlakuan dievaluasi kualitasnya setiap hari selama enam hari.

#### Variabel kualitas spermatozoa yang dievaluasi

Kualitas spermatozoa dievaluasi pada tahap setelah koleksi (spermatozoa segar) serta setelah pengenceran dan preservasi. Kualitas spermatozoa yang dievaluasi pada tahap spermatozoa segar adalah: konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, persentase spermatozoa abnormal, persentase butiran sitoplasma, dan persentase membran plasma utuh (MPU). Sementara itu, evaluasi terhadap spermatozoa yang telah diencerkan dan dipreservasi meliputi: persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase MPU.

Persentase spermatozoa motil; persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Dievaluasi secara subyektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x (RASUL *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan pewarnaan 2% eosin B (TOELIHERE, 1981). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

Persentase MPU dievaluasi dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) (REVELL dan MRODE, 1994). Komposisi larutan hiposmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 200 µl larutan hiposmotik ditambahkan

dengan 20 µl semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Buat preparat ulas tipis pada gelas obyek kemudian evaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

#### Analisis data

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1993).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik spermatozoa epididimis segar sapi Bali

Data karakteristik spermatozoa segar epididimis sapi Bali yang diperoleh (Tabel 1) menunjukkan bahwa spermatozoa tersebut memiliki kualitas yang baik dan memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut, baik dalam bentuk semen cair-dingin maupun semen beku. Hal ini karena spermatozoa segar tersebut memiliki persentase spermatozoa motil rata-rata 75%, spermatozoa abnormal rata-rata 10,5%, dan persentase MPU rata-rata 86,75%. Semen segar yang baik harus memiliki persentase spermatozoa motil  $\geq 70\%$  (EVANS dan MAXWELL, 1987), persentase spermatozoa abnormal 6–10% (DELGADILLO, 1992), dan persentase MPU  $\geq 60\%$  (REVELL dan MRODE, 1994).

**Tabel 1.** Karakteristik spermatozoa segar epididimis sapi Bali

Variabel	Rata-rata $\pm$ SD
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	11.222,50 $\pm$ 455,21
Spermatozoa motil (%)	75,00 $\pm$ 0,00
Spermatozoa hidup (%)	86,75 $\pm$ 0,83
Spermatozoa abnormal (%)	10,50 $\pm$ 1,12
Butiran sitoplasma (%)	14,00 $\pm$ 0,71
Membran plasma utuh (%)	86,75 $\pm$ 1,48

Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa rata-rata 11.222,50 juta sel/ml (kisaran 10.590–11.780 juta sel/ml). Hasil yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan pada sapi sebesar 3.593–4.406 juta sel/ml (SUHENDRA, 2002) dan pada sapi peranakan Ongole

(PO) sebesar 5.053,3 juta sel/ml (FITRIATI, 2007). Konsentrasi spermatozoa cauda epididimis pada hewan mamalia dilaporkan sebesar 10.000–50.000 juta sel/ml (SENGER, 1999), rata-rata 10.445 juta sel/ml pada kerbau belang (YULNAWATI *et al.*, 2008), dan rata-rata 13.993,33 juta sel/ml pada domba Garut (RIZAL, 2005).

Rata-rata persentase spermatozoa motil yang diperoleh pada penelitian ini adalah 75%. FITRIATI (2007) melaporkan persentase spermatozoa motil sebesar 70–75% pada spermatozoa segar epididimis sapi PO. Hasil beberapa penelitian melaporkan bahwa persentase spermatozoa motil asal cauda epididimis segar adalah 64% pada monyet ekor panjang (FERADIS *et al.*, 2001), 70% pada badak putih (LUBBE *et al.*, 1999), 66% pada kuda (SQUIRES *et al.*, 2000), 70–75% pada domba Garut (RIZAL, 2005), dan 65% pada kerbau belang (YULNAWATI *et al.*, 2008). Persentase spermatozoa hidup asal cauda epididimis sapi Bali pada penelitian ini adalah rata-rata 86,75% (kisaran 86–88%). Hasil yang kurang lebih sama dilaporkan FITRIATI (2007) yaitu 84,16% pada spermatozoa asal cauda epididimis sapi PO. YULNAWATI *et al.* (2008) melaporkan persentase spermatozoa hidup pada cauda epididimis kerbau belang rata-rata 79,3%.

Persentase spermatozoa abnormal yang diperoleh dalam penelitian ini rata-rata 10,5% (kisaran 13–15%) dan persentase butiran sitoplasma rata-rata 14% (kisaran 9–11%). Persentase spermatozoa abnormal asal cauda epididimis sapi PO rata-rata 9,33% (FITRIATI, 2007) dan rata-rata 15% pada kerbau belang (YULNAWATI *et al.*, 2008). Rataan persentase spermatozoa abnormal dan butiran sitoplasma spermatozoa epididimis domba Garut masing-masing adalah 10,83 dan 8,5% (RIZAL, 2005). Abnormalitas yang terdapat pada spermatozoa asal cauda epididimis sapi Bali dalam penelitian ini masih berada dalam kisaran normal dan dapat digunakan untuk proses selanjutnya, karena menurut BEARDEN dan FUQUAY (1997) angka morfologi abnormal 8–10% tidak memberikan pengaruh yang cukup berarti bagi fertilitas.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase MPU adalah rata-rata 86,75% (kisaran 85–89%). Peneliti sebelumnya melaporkan persentase MPU yang lebih rendah pada spermatozoa epididimis ternak yang lain, yakni rata-rata 81,33% pada domba Garut (RIZAL, 2005), dan rata-rata 80,8% pada kerbau belang (YULNAWATI *et al.*, 2008).

### **Kualitas spermatozoa setelah preservasi pada suhu 3–5°C**

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan laktosa ke dalam pengencer Tris mampu mempertahankan daya hidup spermatozoa hingga hari keenam preservasi (selama lima hari), dan masih

memenuhi syarat untuk dimanfaatkan dalam program IB karena memiliki persentase spermatozoa motil rata-rata 45% (Tabel 2). Menurut EVANS dan MAXWELL (1987) dan berdasarkan pada Standar Nasional Indonesia (SNI), semen yang memenuhi syarat kualitas digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%. Pada perlakuan kontrol, persentase spermatozoa motil sebesar 40% dapat dipertahankan hanya hingga hari kelima preservasi (selama empat hari).

Penambahan laktosa sebanyak 0,3 dan 0,6 g laktosa per 100 ml pengencer Tris menunjukkan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU yang nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol mulai dari hari ketiga hingga ketujuh preservasi (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa laktosa mampu memberikan perlindungan dan sekaligus sebagai substrat sumber energi bagi spermatozoa selama proses preservasi. Laktosa sebagai salah satu karbohidrat golongan disakarida terdiri atas dua unit monosakarida, yakni satu unit glukosa dan satu unit galaktosa yang keduanya dapat dimetabolisir oleh spermatozoa melalui glikolisis dan/atau siklus Krebs untuk menghasilkan energi berupa adenosin trifosfat (ATP). Adenosin trifosfat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dalam proses pergerakan sehingga dapat tetap motil dan sekaligus untuk mempertahankan daya hidupnya.

Laktosa juga berperan sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari proses kerusakan akibat pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) selama penyimpanan pada suhu rendah (3–5°C). Hal ini ditandai oleh adanya pengaruh yang nyata akibat penambahan laktosa terhadap persentase MPU dibandingkan dengan kontrol, mulai dari hari ketiga hingga ketujuh preservasi (Tabel 2). Menurut WHITE (1993) pengaruh kejutan dingin berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma sel, yakni perubahan bentuk dari cair ke gel yang terjadi pada suhu di bawah 20°C. Perubahan tatanan rantai asam lemak dan protein pada membran plasma menyebabkan kebocoran atau selektivitas membran plasma rusak, yang menyebabkan ion-ion seperti ion kalsium bebas masuk ke sel. Oleh karena itu, preservasi spermatozoa pada suhu yang mendekati 0°C diperlukan zat pelindung di dalam pengencer, seperti fosfolipid kuning telur dan krioprotektan, serta proses pendinginan harus dilakukan secara bertahap (KAYSER *et al.*, 1992). Menurut SUPRIATNA dan PASARIBU (1992) karbohidrat merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler, dan berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Membran plasma sel yang tetap utuh akan memberikan pengaruh positif terhadap motilitas (daya gerak) dan

**Tabel 2** Persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU spermatozoa epididimis sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3–5°C

Variabel kualitas spermatozoa	Laktosa (g/100 ml)	Preservasi hari ke-						
		1	2	3	4	5	6	7
Spermatozoa motil (%)	0,0	75,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	67,00 ± 2,45 <sup>a</sup>	53,00 ± 4,00 <sup>a</sup>	47,00 ± 2,45 <sup>a</sup>	42,00 ± 2,45 <sup>a</sup>	37,00 ± 2,45 <sup>a</sup>	29,00 ± 2,00 <sup>a</sup>
	0,3	75,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	68,00 ± 2,45 <sup>a</sup>	62,00 ± 2,45 <sup>b</sup>	57,00 ± 2,45 <sup>b</sup>	49,00 ± 2,00 <sup>b</sup>	45,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	39,00 ± 2,00 <sup>b</sup>
	0,6	75,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	69,00 ± 2,00 <sup>a</sup>	60,00 ± 3,16 <sup>b</sup>	55,00 ± 3,16 <sup>b</sup>	50,00 ± 3,16 <sup>b</sup>	45,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	39,00 ± 2,00 <sup>b</sup>
Spermatozoa hidup (%)	0,0	85,80 ± 0,98 <sup>a</sup>	78,20 ± 2,31 <sup>a</sup>	63,00 ± 3,16 <sup>a</sup>	58,00 ± 1,09 <sup>a</sup>	50,40 ± 2,73 <sup>a</sup>	47,00 ± 2,61 <sup>a</sup>	41,80 ± 1,17 <sup>a</sup>
	0,3	86,60 ± 0,98 <sup>a</sup>	80,60 ± 1,02 <sup>a</sup>	71,60 ± 1,74 <sup>b</sup>	69,20 ± 1,47 <sup>b</sup>	61,60 ± 2,06 <sup>b</sup>	55,40 ± 2,06 <sup>b</sup>	50,60 ± 1,36 <sup>b</sup>
	0,6	86,60 ± 0,98 <sup>a</sup>	82,60 ± 1,02 <sup>a</sup>	71,20 ± 1,17 <sup>b</sup>	66,20 ± 2,31 <sup>b</sup>	60,20 ± 2,92 <sup>b</sup>	56,20 ± 1,33 <sup>b</sup>	51,40 ± 2,15 <sup>b</sup>
MPU (%)	0,0	86,40 ± 0,80 <sup>a</sup>	77,80 ± 1,47 <sup>a</sup>	69,60 ± 0,80 <sup>a</sup>	61,20 ± 1,47 <sup>a</sup>	58,40 ± 3,14 <sup>a</sup>	49,60 ± 1,85 <sup>a</sup>	42,40 ± 1,85 <sup>a</sup>
	0,3	85,60 ± 0,54 <sup>a</sup>	81,40 ± 1,50 <sup>a</sup>	73,20 ± 0,75 <sup>b</sup>	67,80 ± 1,30 <sup>b</sup>	65,20 ± 2,13 <sup>b</sup>	55,80 ± 1,17 <sup>b</sup>	51,60 ± 1,62 <sup>b</sup>
	0,6	85,60 ± 0,54 <sup>a</sup>	81,60 ± 1,02 <sup>a</sup>	73,00 ± 1,41 <sup>b</sup>	67,80 ± 0,98 <sup>b</sup>	65,60 ± 1,02 <sup>b</sup>	56,00 ± 1,41 <sup>b</sup>	51,80 ± 1,33 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama masing-masing variabel kualitas, menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

daya hidup spermatozoa. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan berlangsung dengan baik hanya jika membran plasma sel tetap dalam keadaan utuh. Hal ini karena menurut LEHNINGER (1994) membran plasma sel berperan dalam mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Membran plasma sel mengandung karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid) atau dengan protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks (LEHNINGER, 1994). Hal ini yang dapat menjelaskan mengapa karbohidrat disebut sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler. Diduga karbohidrat yang ditambahkan di dalam pengencer berfungsi melindungi glikokaliks membran plasma sel spermatozoa dari proses kerusakan selama preservasi semen. Karbohidrat tidak dapat menembus membran plasma sel secara difusi bebas karena tidak larut di dalam lemak dan memiliki berat molekul besar, sehingga sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, karbohidrat melindungi sel dari luar (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992). Menurut VISWANATH dan SHANNON (2000) senyawa krioprotektan golongan karbohidrat seperti laktosa memiliki kemampuan menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar *hydrated*. Sifat-sifat laktosa ini akan membantu menstabilkan membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas. AISEN *et al.* (2002) menyatakan golongan karbohidrat disakarida berperan menggantikan posisi air pada permukaan membran plasma sel yang langsung berhubungan dengan pengencer. Selanjutnya dinyatakan bahwa laktosa dapat berinteraksi langsung dengan gugus pusat fosfolipid polar selama pembekuan, dan menurunkan interaksi ikatan van der Waals di antara rantai karbon.

LEHNINGER (1994) menyatakan laktosa merupakan salah satu senyawa pereduksi dan memiliki struktur yang stabil. Sebagai senyawa pereduksi, laktosa memiliki fungsi yang mirip dengan senyawa antioksidan karena mampu meredam senyawa-senyawa pengoksidasi, sehingga juga berperan dalam meminimalkan terjadinya reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi bersifat merugikan karena menghasilkan produk yang dapat merusak integritas membran plasma sel. Sebagai senyawa yang stabil, laktosa tidak mudah mengalami perubahan struktur menjadi bentuk ion yang dapat mengubah tekanan osmotik larutan pengencer semen. Perubahan tekanan osmotik larutan pengencer menjadi hiposmotik atau hiperosmotik dapat menyebabkan kematian spermatozoa.

Perbaikan kualitas spermatozoa epididimis akibat penambahan gula ke dalam pengencer juga dilaporkan

pada kerbau belang. Penambahan sukrosa (RIZAL *et al.*, 2007), maltosa (HERDIS *et al.*, 2008), dan rafinosa (YULNAWATI *et al.*, 2008) ke dalam pengencer komersial AndroMed<sup>®</sup> dapat meningkatkan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing*.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU pada hari ketujuh preservasi masing-masing sebesar 29; 41,8; dan 42,4% untuk perlakuan 0 g laktosa, 39; 50,6; dan 51,6% untuk perlakuan 0,3 g laktosa, serta 39; 51,4; dan 51,8% untuk perlakuan 0,6 g laktosa. Penambahan laktosa sebanyak 0,3 dan 0,6 g per 100 ml pengencer Tris mampu memperpanjang daya hidup spermatozoa epididimis sapi Bali yang diperservasi pada suhu 3–5°C dan masih memenuhi syarat untuk dimanfaatkan dalam program IB setelah lima hari preservasi, sedangkan yang tanpa penambahan laktosa hanya selama empat hari.

## DAFTAR PUSTAKA

- AISEN, E.G., H.L. ALVAREZ, A. VENTURINO and J.J. GARDE. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- AISEN, E.G., V.H. MEDINA and A. VENTURINO. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- ANEL, L., F. MARTINEZ, M. ALVAREZ, E. ANEL, J.C. BOIXO, M. KAABI, P. DE PAZ, C. CHAMORRO and P. HERRAEZ. 1999. Post-mortem spermatozoa recovery and freezing in a cantabric brown bear (*Ursus arctos*): A preliminary report. *Theriogenology* 51: 277.
- BRAVO, P.W., V. ALARCON and R.H. BONDURANT. 2000. Epididymal spermatozoa characteristics and its use on artificial insemination of llamas and alpacas. Proceeding 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. Abstracts Vol. 2. p. 92.
- BEARDEN, H.J. and J.W. FUQUAY. 1997. Applied Animal Reproduction 4<sup>th</sup> Ed. Prentice Hall, Upper Saddle, New Jersey.
- DELGADILLO, J.J., B. LEBOEUF and P. CHEMINEAU. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum. Res.* 9: 47-59.
- DE LOS REYES, M., L. SAENZ, L. LAPIERE, J. CROSBY and C. BARROS. 2000. *In vitro* evaluation of boar spermatozoa frozen with permeable and non-permeable cryoprotectant. Proceeding of 14<sup>th</sup> International

- Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. Abstracts Vol. 2. p. 161.
- EVANS, G. and W.M.C. MAXWELL. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, London.
- FERADIS, A.H., D. PAWITRI, I.K. SUATHA, M. RIZAL AMIN, T.L. YUSUF, D. SAJUTHI, I.N. BUDIARSA and E.S. HAYES. 2001. Cryopreservation of epididymal spermatozoa collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Primatol.* 30: 100-106.
- FITRIATI, M. 2007. Pengaruh Pengencer Susu Skim, Tris dan Sitrat Kuning Telur terhadap Kualitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Cauda Epididimidis Sapi Peranakan Ongole (PO) pada Penyimpanan 4-5°C. *Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran, Bandung.*
- GARDE, J., E. ANEL, A. GARCIA-DIAZ, J.C. BOIXO, A. SOLER, P. DE PAZ, A. LOPEZ-SAER, C. GUERRA and L. ANEL. 2000. Evaluation of two glycerol concentrations in freezing of electroejaculated and epididymal spermatozoa from iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Proceeding 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. Abstracts Vol. 2. p. 142.
- GRAHAM, J.K. 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during cryopreservation process. *Theriogenology* 46: 1151-1162.
- HAFEZ, E.S.E. and B. HAFEZ. 2000. Reproduction in Farm Animals 7<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
- HERDIS. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). *Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.*
- HERDIS, M. RIZAL, A. BOEDIONO, R.I. ARIFANTINI, T. SAILI, A.S. AKU dan YULNAWATI. 2005. Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J. Pengemb. Petern. Tropis* 30: 229-236.
- HERDIS, M. SURACHMAN, YULNAWATI, M. RIZAL dan H. MAHESHWARI. 2008. Viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan maltosa dalam pengencer AndroMed®. *J. Pengemb. Petern. Tropis* 33: 101-106.
- HEROLD, F.C., J.E. AURICH and D. GERBER. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromed® and Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-724.
- HEROLD, F.C., K. DE HAAS, B. COLENBRANDER and D. GERBER. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology* 66: 1123-1130.
- KAYSER, J.P., R.P. AMANN, R.K. SHIDEFER, E.L. SQUIRES, D.J. JASKO and B.W. PICKETT. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 30: 601-614.
- KIKUCHI, K., T. NAGAI, N. KASHIWAZAKI, H. IKEDA, J. NOGUCHI, A. SHIMADA, E. SOLOY and H. KANEKO. 1998. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology* 50: 615-623.
- LEHNINGER, A.L. 1994. Dasar-dasar Biokimia Jilid 2. Alih bahasa: M. Thenawijaya. Erlangga, Jakarta.
- LUBBE, K., R.L. SMITH, P. BARTELS and R.A. GODKE. 1999. Freezing epididymal sperm from white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) treated with different diluents. *Theriogenology* 51: 288. Abstract.
- MOLINIA, F.C., G. EVANS, P.I. GUINTANA-CASARES and W.M.C. MAXWELL. 1993. Effect of monosaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosomes integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 113-122.
- RASUL, Z., N. AHMAD and M. ANZAR. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.* 22: 278-283.
- REVELL, S.G. and R.A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- RIZAL, M. 2005. Fertilitas Spermatozoa Ejakulat dan Epididimis Domba Garut Hasil Kriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris dengan Berbagai Krioprotektan dan Antioksidan. *Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.*
- RIZAL, M. 2006. Pengaruh penambahan laktosa di dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen cair domba Garut. *J. Pengemb. Petern. Tropis* 31: 224-231.
- RIZAL, M., HERDIS, A. BOEDIONO, A.S. AKU dan YULNAWATI. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *JITV* 11: 123-130.
- RIZAL, M., HERDIS, YULNAWATI dan H. MAHESHWARI. 2007. Peningkatan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang dikriopreservasi dengan beberapa konsentrasi sukrosa. *J. Veteriner* 8: 188-193.
- SANKAI, T., K. TERAOKA, R. YANAGIMACHI, F. CHO and Y. YOSHIKAWA. 1994. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 101: 273-278.
- SENGER, P.L. 1999. Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conception Inc., Pullman.
- SINGH, M.P., A.K. SINHA and B.K. SINGH. 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1047-1053.
- SOLER, A.J., M.D. PEREZ-GUSMAN and J.J. GARDE. 2003. Storage of red deer epididymides for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphology integrity. *J. Exp. Zool.* 295A: 188-199.

- SQUIRES, E.L., C. GOMEZ-CUETARA and J.K. GRAHAM. 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Proceeding 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. ICAR. Stockholm, Sweden. Abstracts Vol. 2. p. 166.
- STEEL, R.G.D. dan J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik. Alih bahasa: B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- SUHENDRA. 2002. Kajian Beberapa Parameter Kualitas Spermatozoa Sapi pada Tiap Bagian Epididimis. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SUPRIATNA, I. dan F.H. PASARIBU. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SUWARSO. 1999. Peranan Rafinosa dalam Pengencer Tris-Sitrat-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. *Tesis*. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- TOELIHERE, M.R. 1981. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- TOLLNER, T.L., C.A. VAN DE VOORT, J.W. OVERSTREET and E.Z. DROBNIS. 1990. Cryopreservation of epididymal spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J. Reprod. Fertil.* 90: 347-352.
- VISWANATH, R. and P. SHANNON. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 23-53.
- WHITE, I.G. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 639-658.
- WOELDERS, H., A. MATTHIJ and B. ENGEL. 1997. Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93-105.
- YULNAWATI, HERDIS, H. MAHESHWARI dan M. RIZAL. 2008. Kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan raffinosa sebagai krioprotektan ekstraseluler. *JITV* 13: 30-34.