

PENGARUH BAHAN PENGECER *GLUCOSE-CITRATE*-KUNING TELUR DAN ARAS *GLYCEROL* PADA KUALITAS *SPERMATOZOA* KAMBING BLIGON SETELAH DICUCI DAN DIBEKUKAN PADA SUHU -196°C

Ismaya dan Sunardi¹

INTISARI

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pencucian *spermatozoa*, aras kuning telur (5%, 10%, 15% dan 20%) dan aras gliserol (5% dan 10%) pada motilitas *spermatozoa*, persentase *spermatozoa* hidup dan abnormalitas *spermatozoa* sesudah dibekukan pada nitrogen cair (-196°C). Masing-masing perlakuan disimpan didalam nitrogen cair selama 1, 2, 3, dan 4 minggu. Empat kali ulangan dilakukan dalam penelitian ini. Data dianalisis dengan menggunakan analisis varian pola faktorial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pencucian dan penyimpanan di dalam nitrogen cair berpengaruh secara nyata ($P < 0.5$) pada motilitas *spermatozoa*, tetapi tidak pada persentase *spermatozoa* hidup dan abnormalitas *spermatozoa* berfluktuasi. Tidak ada interaksi antara aras kuning telur dan aras gliserol pada motilitas, daya hidup dan abnormalitas *spermatozoa*. Pencucian *spermatozoa* mempunyai kualitas yang lebih baik dibanding *spermatozoa* yang tidak dicuci.

(Kata kunci: Kambing Bligon, Pencucian, Pengenceran, Pembekuan sperma)

Buletin Peternakan 30 (1) : 17 - 27, 2006

¹ Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

EFFECTS OF DILUTION OF GLUCOSE-CITRATE-EGG YOLK AND GLYCEROL LEVEL ON THE QUALITY OF BLIGON GOAT SPERM AFTER WASHING AND FROZEN IN -196 °C

ABSTRACT

The objectives of this study were to determine the effects of washing of goat sperm, level of egg yolk (5%, 10%, 15% and 20%), level of glycerol (5% and 10%) on the motility and percentage of life sperm and abnormality of sperm after frozen in the liquid nitrogen (-196 °C). Each treatment was stored at the liquid nitrogen for 1, 2, 3 and 4 weeks. Four replications were used in this experiment. Data were analyzed using analysis of variance in factorial design. The results showed that washing and storing in the liquid nitrogen were affected significantly ($P < 0.05$) on the motility of sperm, but not on the percentage of life sperm, and abnormality of sperm was fluctuated. There was no interaction between the level of egg yolk and the level of glycerol on the motility, life sperm and abnormality of sperm. Washing sperm had a better quality compared with unwashing sperm.

(Key words: Bligon Goat, Washing, Dilution, Frozen semen)

Pendahuluan

Plasma sperma kambing mengandung enzim *phospholipase A* yang disekresikan oleh kelenjar *bulbourethralis* yang dapat mengkatalis hidrolisa *lecithin* dalam kuning telur menjadi asam lemak dan *lyssolecithin* yang menyebabkan racun bagi *spermatozoa*. Sehingga dianjurkan agar plasma sperma dibuang segera mungkin setelah penampungan yaitu dengan mencuci sperma menggunakan larutan *krebs ringer phosphate glucose* (Chemineau dan Cagnie, 1991).

Kuning telur mengandung kolesterol dan karoten yang mampu menstimuli aktivitas dehidrogenase suksinat, malat, gliseraldehide, phosphate sperma dan mengandung komponen lain yang bekerja sebagai substrat oksidasi pelindung *enzyme sulfhidril* dan factor aglutinasi didalam seminal plasma (Salisbury dan VanDemark, 1985). *Lechitin* mengandung *glycerol* dan asam lemak, tetapi juga mengandung phosphat dan cholin. *Lechitin* mempunyai fungsi structural dan metabolisme pada membran *spermatozoa*, sedangkan lipoprotein berfungsi sebagai pengemban utama lipida plasma. Gabungan lipida dan protein tersebut, merupakan fungsi untuk transport

lemak dalam medium terutama air, seperti plasma sperma (Harper *et al.*, 1980).

Sperma kambing PE yang diencerkan dengan glukosa sitrat-kuning telur 20% dapat disimpan pada suhu 5 °C selama 3-4 hari (Sunardi, 1989). Deka dan Rao (1986) menyatakan bahwa aras kuning telur 10% dan 20% dalam bahan pengencer Tris sitrat-kuning telur, fruktose dan *glycerol* mampu memberikan motilitas yang baik. *Glycerol* sering ditambahkan pada bahan pengencer sperma, karena *glycerol* sebagai krioprotektan yang mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat proses pendinginan/pembekuan (Salisbury dan VanDemark, 1985). Penambahan *glycerol* pada sitrat-kuning telur secara optimal berkisar antara 7% - 7,6% (Hafez, 1993).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pencucian spermatozoa, bahan pengencer *glucose-citrate*- kuning telur dan *level glycerol* yang berbeda dengan menggunakan *filling and sealing machine* dalam proses pengisian sperma dan pembekuannya didalam kontainer pada suhu -196 °C.

Materi dan Metode

Penampungan sperma

Dalam penelitian ini digunakan 6 ekor kambing Bligon jantan fertil berumur 1,5 tahun dan seekor induk kambing betina sebagai perangsang saat penampungan sperma. Penampungan sperma dilakukan dengan menggunakan vagina buatan, berdasarkan standar penampungan (Evans and Maxwell, 1987). Penampungan dilakukan pada pagi hari sekitar jam 7.00 – 8.00, hasil penampungan dari 6 ekor kambing dijadikan satu dalam tabung penampung, penampungan dilakukan seminggu dua kali selama 6 minggu.

Pencucian sperma

Dalam penelitian ini, hasil penampungan sperma dibagi menjadi dua bagian (A dan B), bagian A dicuci dan bagian B tidak dicuci. Pencucian spermatozoa dengan menggunakan larutan Krebs Ringer Phosphate Glucose (Chermineau dan Cagnie, 1991). Pencucian dilakukan dengan cara menambahkan larutan Krebs Ringer Phosphate Glucose sebanyak 8 bagian pada satu bagian sperma pada tabung sentrifugasi. Sentrifugasi dilakukan selama 15 menit (800 rpm) pada suhu 20 °C. Cairan bening (supernatan) dibuang dengan menggunakan mikropipet, kemudian sisanya ditambahkan larutan Krebs Ringer Phosphate Glucose lagi dan dilakukan sentrifugasi dan pembuangan supernatan sebagaimana diatas.

Prosesing sperma

Kemudian masing-masing sperma (bagian A dan B) diencerkan berdasarkan perlakuannya, yaitu aras kuning telur yang berbeda (5%, 10%, 15% dan 20%) dan aras *glycerol* (5% dan 10%). Volume tiap bahan pengencer tersebut dibagi dalam 3 bagian antara lain part A - Primer, part A - Extra dan part B. Untuk pengencer part A - Primer dan part A - Extra terdiri dari bahan pengencer dasar *glucose-citrate* ditambahkan dengan kuning telur sesuai dengan perlakuannya,

sedangkan untuk bagian B terdiri dari pengencer part A ditambahkan dengan perlakuan *glycerol*. Sperma yang akan diproses dicampur dengan part A primer yang telah disimpan dalam *water jacket* suhu 37° C diberi label dan disimpan dalam *refrigerator* suhu 5° C selama 35 menit selanjutnya disebut campuran I. Setelah 35 menit *water jacket* dilepaskan dari campuran I dan 50 menit kemudian dilakukan pencampuran part A - Extra yang telah dipersiapkan di dalam *refrigerator*, selanjutnya disebut campuran II. Setelah 15 menit, pengencer part B dicampurkan ke dalam campuran II, pencampuran dengan part B tersebut dilakukan 4 kali setiap 15 menit di dalam *refrigerator* proses ini disebut gliserolisasi. Setelah part B tercampur seluruhnya maka dilakukan proses ekuilibrisasi selama 2,5 jam. Setelah proses ekuilibrisasi selesai, dilakukan proses pengemasan sperma cair dalam *straw* 0,5 ml dengan bantuan mesin *filling sealing*. Proses *filling sealing* dilakukan pada suhu ruangan 20°C. *Straw* yang sudah terisi sperma cair disusun dalam goblet dan dimasukkan dalam *canister* kemudian dilakukan *pre freezing* dengan menempatkan *canister* tersebut 5 cm di atas nitrogen cair selama 9 menit tujuan *pre freezing* adalah untuk mencegah *lethal* akibat *cold shock*. Setelah 9 menit, *canister* dimasukkan perlahan ke dalam nitrogen cair untuk tahap *freezing*. Sperma beku tersebut disimpan dalam kontainer *XT 10* merk *Taylor Wharton, USA*. Prinsip tersebut diatas dilakukan pada setiap perlakuan.

Analisis data

Data yang meliputi motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa setelah dibekukan pada nitrogen cair, baik pada sperma yang dicuci maupun yang tidak dicuci dianalisis dengan analisis varian dengan rancangan faktorial, dengan menggunakan *SPSS software program* (SPSS 11.0 Brief Guide, New Jersey, USA).

Hasil dan Pembahasan

Dari hasil penelitian ini ditunjukkan bahwa motilitas spermatozoa setelah dibekukan mengalami penurunan dari 80% saat sebelum dibekukan menjadi 30% setelah dibekukan pada spermatozoa yang mengalami pencucian dan menjadi 10% pada spermatozoa yang tidak dicuci (Gambar 1 dan 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa sebelum dibekukan relative sama (Gambar 1 dan 2), walau demikian pada perlakuan dengan bahan pengencer kuning telur 10% dan glycerol 10% (Gambar 1 D) motilitas spermatozoa yang dicuci plasma spermanya menunjukkan lebih baik secara nyata ($P < 0,05$).

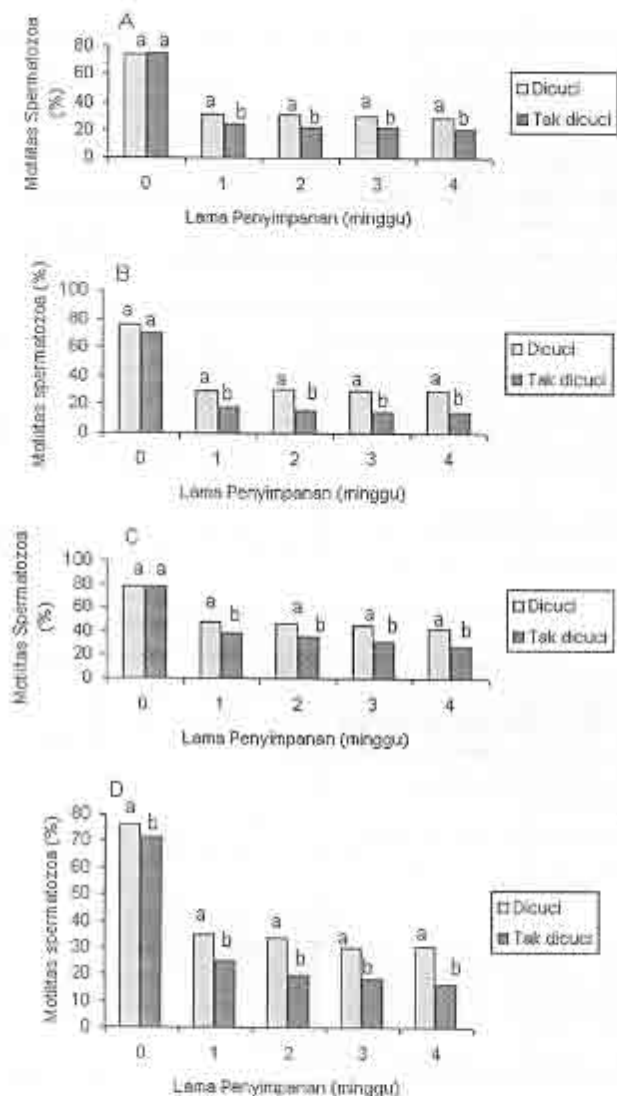
Setelah spermatozoa dibekukan pada suhu minus 196°C selama 1, 2, 3 dan 4 minggu motilitas spermatozoa mengalami penurunan secara nyata ($P < 0,05$) jika dibanding dengan motilitas sebelum diencerkan (Gambar 1 dan 2). Motilitas spermatozoa setelah dibekukan pada minggu ke 1, 2, 3 dan 4 menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) bahwa spermatozoa yang dicuci plasma spermanya sebelum dilakukan pengenceran dan pembekuan lebih baik dari pada spermatozoa yang tidak dicuci (Gambar 1, 2). Hasil penelitian ini sejalan dengan apa yang dilaporkan oleh Wibowo (1997) bahwa pencucian spermatozoa memberikan hasil motilitas yang lebih baik dari pada yang tidak dicuci.

Persentase spermatozoa hidup mengalami penurunan secara nyata dari sebelum dibekukan (80%) menjadi sekitar 50% - 60% setelah dibekukan selama empat minggu (Gambar 3 dan 4). Persentase spermatozoa hidup setelah dibekukan hingga empat minggu juga mengalami penurunan baik pada spermatozoa yang dicuci maupun

yang tidak dicuci. Namun demikian pada setiap perlakuan antara spermatozoa yang dicuci maupun yang tidak dicuci selama dibekukan tidak ada perbedaan persentase spermatozoa yang hidup, kecuali pada minggu ke 2 (Gambar 3 B) dan minggu ke 4 (Gambar 3 C). Hal tersebut belum diketahui apa penyebabnya.

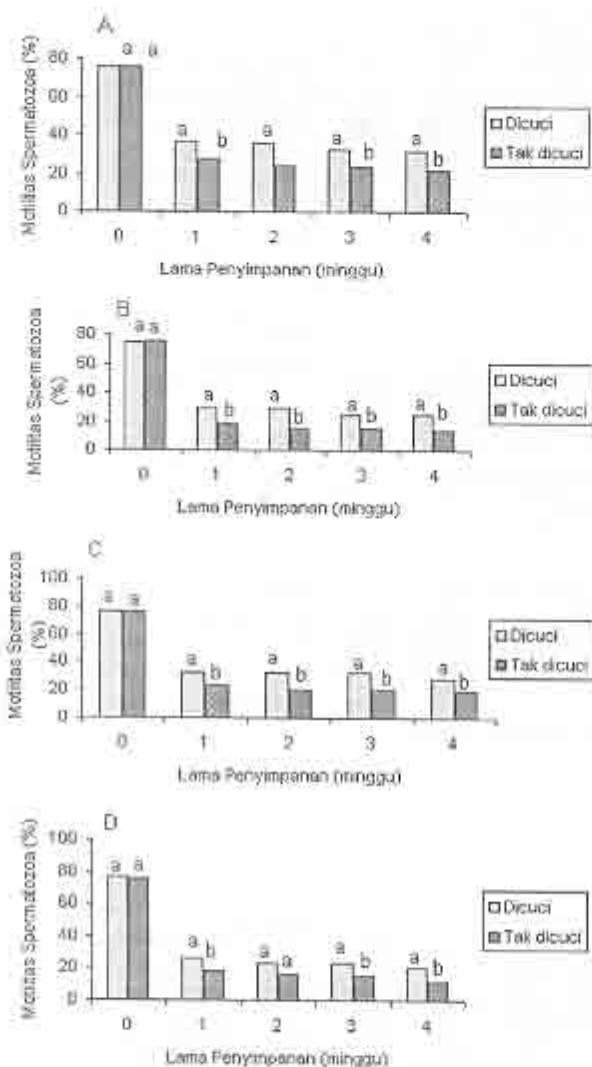
Persentase abnormalitas spermatozoa pada spermatozoa yang dicuci maupun yang tidak dicuci mengalami kenaikan dari sebelum dibekukan (15%) menjadi 20% (Gambar 5, 6). Persentase abnormalitas spermatozoa tampaknya cenderung meningkat setelah spermatozoa dibekukan hingga empat minggu (Gambar 5, 6). Abnormalitas spermatozoa pada spermatozoa yang dicuci menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada minggu ke 1 (Gambar 5 A), minggu ke 0 dan ke 1 (Gambar 5 B), minggu ke 1 (Gambar 5 C) dan pada minggu ke 0 dan ke 1 (Gambar 5 D) hal tersebut dimungkinkan karena pengaruh saat dilakukan sentrifugasi banyak spermatozoa menjadi rusak. Namun sebaliknya pada minggu ke 4 justru spermatozoa yang tidak dicuci mempunyai abnormalitas spermatozoa yang lebih tinggi dari pada spermatozoa yang dicuci (Gambar 5 D). Dalam penelitian ini juga tidak ditunjukkan adanya interaksi antara aras kuning telur dengan aras glycerol terhadap motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa setelah dibekukan.

Abnormalitas spermatozoa yang diencerkan dengan kuning telur 15% dan 20% dengan glycerol 5% dan 10% (Gambar 6 A,B,C,D) menunjukkan peningkatan yang sangat nyata ($P < 0,05$) setelah dibekukan selama 4 minggu dibanding sebelum dibekukan. Abnormalitas spermatozoa yang dicuci dan tidak dicuci cukup bervariasi (Gambar 6).



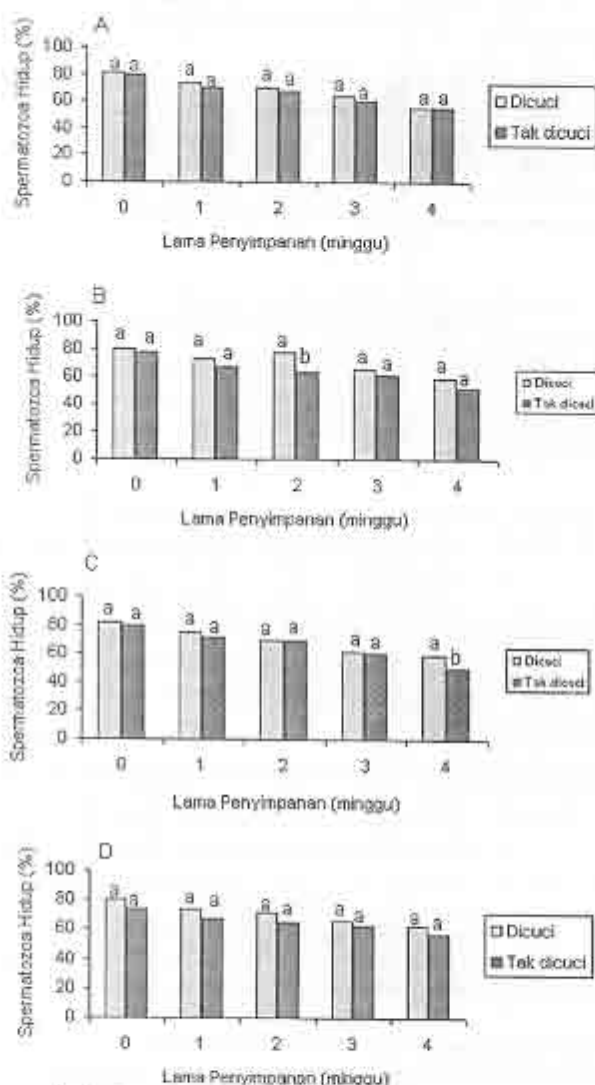
^{ab} Superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) (Different superscript at the same coloum indicating significant differences ($P < 0,05$))

Gambar 1. Motilitas spermatozoa beku pada bahan pengencer yang mengandung Kuning telur 5%, Gliserol 5% (Gambar 1A); Kuning telur 5%, Gliserol 10% (Gambar 1B); Kuning telur 10%, Glycerol 5% (Gambar 1 C) dan Kuning telur 10%, Gliserol 10% (Gambar 1D). Frozen sperm motility in dilutant of egg yolk (5%), Glycerol 5% (Figure 1A); Egg yolk 5%, Glycerol 10% (Figure 1B); Egg yolk 10%, Glycerol 5% (Figure 1C) and Egg yolk 10%, Glycerol 10% (Figure 1D))



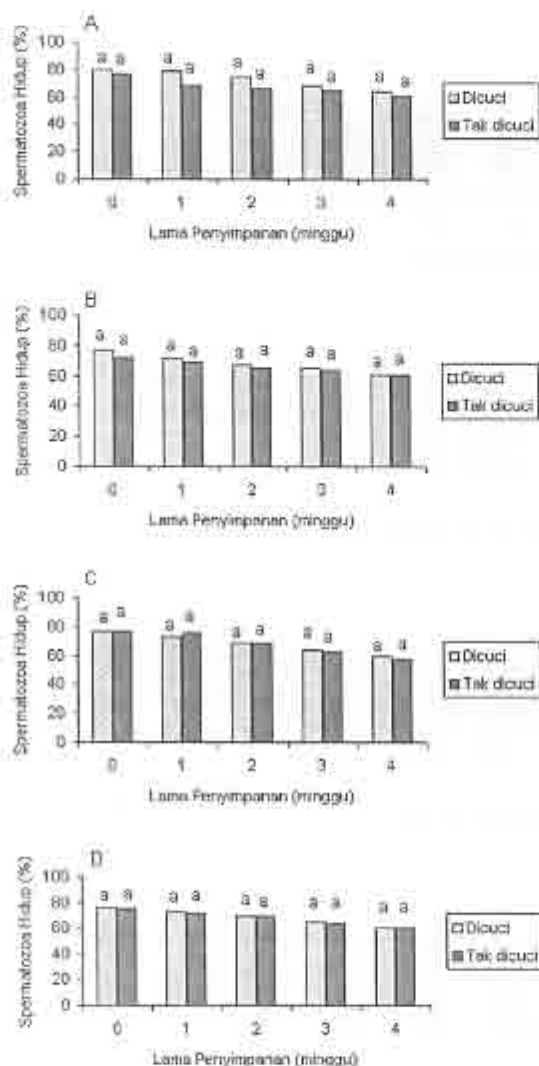
^{ab} Superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) (Different superscript in the same columns indicating significant difference ($P < 0.05$))

Gambar 2. Motilitas spermatozoa beku pada bahan pengencer yang mengandung Kuning telur 15%, Gliserol 5% (Gambar 2A); Kuning telur 15%, Gliserol 10% (Gambar 2B); Kuning telur 20%, Gliserol 5% (Gambar 2C) dan Kuning telur 20%, Gliserol 10% (Gambar 2D) (Frozen sperm motility in the dilutant of egg yolk 15%, Glycerol 5% (Figure 2A); Egg yolk 15%, Glycerol 10% (Figure 2B); Egg yolk 20%, Glycerol 5% (Figure 2C); and Egg yolk 20%, Glycerol 10% (Figure 2D))



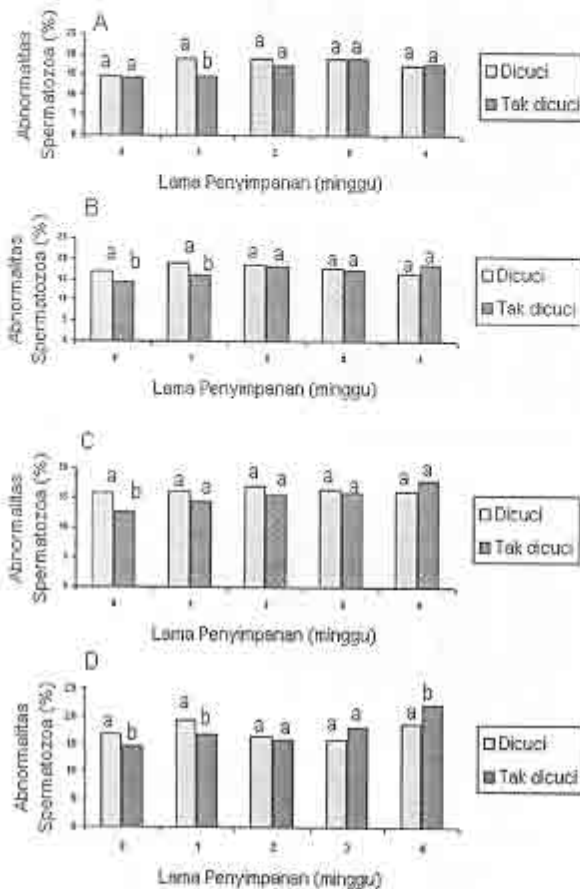
^{ab} Superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) (Different superscript in the same coloumn indicating significant difference ($P < 0.05$))

Gambar 3. Persentase spermatozoa hidup setelah dibekukan dengan bahan pengencer Kuning telur 5%, Gliserol 5% (Gambar 3A); Kuning telur 5%, Gliserol 10% (Gambar 3B); Kuning telur 10%, Gliserol 5% (Gambar 3C) dan Kuning telur 10%, Gliserol 10% (Gambar 3D) (Percentage of life sperm after frozen by dilutant of Egg yolk 5%, Glycerol 5% (Figure 3A); Egg yolk 5%, Glycerol 10% (Figure 3B); Egg yolk 10%, Glycerol 5% (Figure 3C); and Egg yolk 10%, Glycerol 10% (Figure 3D))



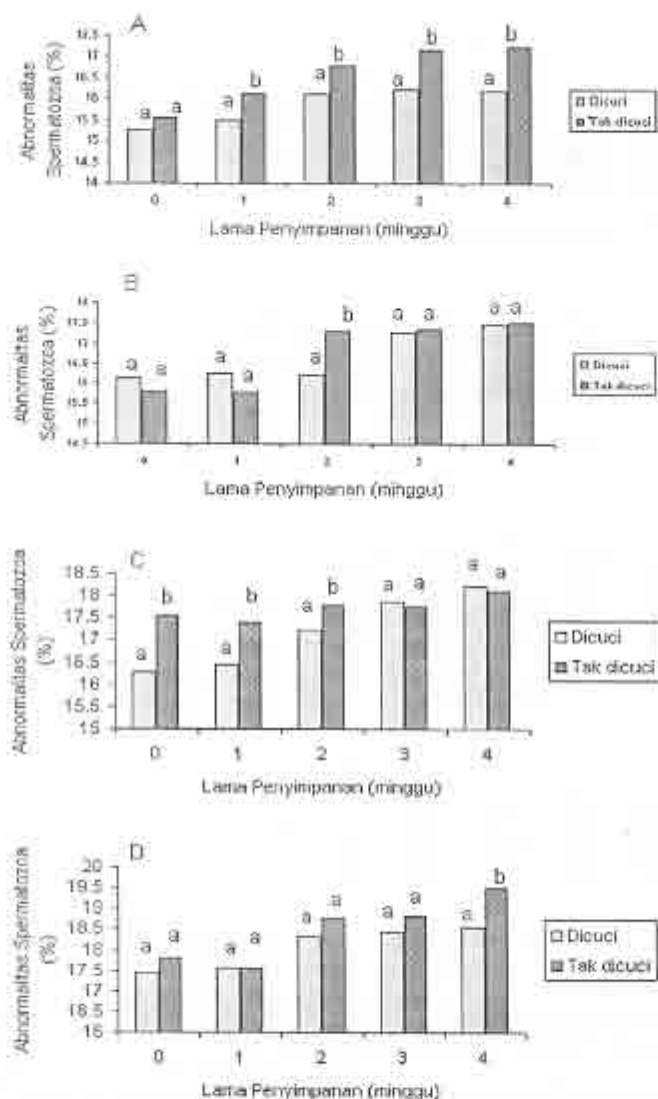
^{ab} Superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) (Different superscript at the same coloumn Indicating significant differences ($P < 0.05$))

Gambar 4. Persentase spermatozoa hidup setelah dibekukan dengan bahan pengencer Kuning telur 15%, Gliserol 5% (Gambar 4A); Kuning telur 15%, Gliserol 10% (Gambar 4B); Kuning telur 20%, Gliserol 5% (Gambar 4C) dan Kuning telur 20%, Gliserol 10% (Gambar 4D) setelah dibekukan pada nitrogen cair. (Percentage of life sperm after frozen by dilutant of Egg yolk 15%, Glycerol 5% (Figure 4A); Egg yolk 15%, Glycerol 10% (Figure 4B); Egg yolk 20%, Glycerol 15% (Figure 4C) and Egg yolk 20%, Glycerol 10% (Figure 4D), after frozen in liquid nitrogen))



^{ab} Superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) (Different superscript at the same column indicating significant differences ($P < 0.05$))

Gambar 5. Persentase abnormalitas spermatozoa di dalam bahan pengencer Kuning telur 5%, Gliserol 5% (Gambar 5A); Kuning telur 5%, Gliserol 10% (Gambar 5B); Kuning telur 10%, Gliserol 5% (Gambar 5C) dan Kuning telur 10%, Gliserol 10% (Gambar 5D) setelah dibekukan pada nitrogen cair (Percentage of sperm abnormality in the dilutant of Egg yolk 5%, Glycerol 5% (Figure 5A); Egg yolk 5%, Glycerol 10% (Figure 5B); Egg yolk 10%, Glycerol 5% (Figure 5C) and Egg yolk 10%, Glycerol 10% (Figure 5D) after frozen in liquid nitrogen)



^{ab} Superkrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) (Different superscript at the same coloum indicating significant differences ($P < 0.05$))

Gambar 6. Persentase abnormalitas spermatozoa di dalam bahan pengencer Kuning telur 15%, Gliserol 5% (Gambar 6A); Kuning telur 15%, Gliserol 10% (Gambar 6B); Kuning telur 20%, Gliserol 5% (Gambar 6C) dan Kuning telur 20%, Gliserol 10% (Gambar 6D) setelah dibekukan pada nitrogen cair (Percentage of sperm abnormality in dilutant of Egg yolk 15%, Glycerol 5% (Figure 6A) Egg yolk 15%, Glycerol 10% (Figure 6B); Egg yolk 20%, Glycerol 5% (Figure 6C) and Egg yolk 20%, Glycerol 10% (Figure 6D) after frozen in liquid nitrogen))

Dari hasil penelitian ini, ditunjukkan bahwa masih belum adanya hasil yang konsisten memberikan gambaran bahan pengencer yang cukup baik, dan masih diperlukan studi-studi yang lain untuk menentukan bahan pengencer yang baik dan dengan fertilitas yang tinggi. Persoalan bahan pengencer, sperma cair dan proses pembekuan sperma kambing dan domba masih menjadi persoalan yang menarik untuk didiskusikan (Leboeuf dan Salamon, 2000; Salamon dan Maxwell, 2000).

Kesimpulan

Persentase motilitas spermatozoa setelah dibekukan mengalami penurunan sampai 50% dari sebelum dibekukan. Dengan persentase spermatozoa hidup setelah dibekukan juga mengalami penurunan sekitar 20% dibanding sebelum dibekukan. Persentase abnormalitas spermatozoa yang dibekukan sedikit meningkat dibanding sebelum dibekukan. Pencucian sperma sebelum diencerkan dan dibekukan memberikan pengaruh yang baik jika dibanding dengan sperma yang tidak dicuci. Bahan pengencer kuning telur 15% dan aras glycerol 5% adalah merupakan kombinasi perlakuan yang terbaik.

Daftar Pustaka

- Chemineau, P. dan Y. Cagnie. 1991. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goat. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.
- Deka BC and A.R. Rao. 1986. Effect of egg yolk levels on quality of frozen buck semen. *Journal of Indian Veterinary* 63: 909-912
- Evans G and W.M.C. Maxwell. 1987 *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Sydney
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction in farm Animals*. 6th ed. Lea and Febiger Philadelphia.
- Harper, H.A, W.R. Victor and A.M. Peter. 1980. *Review of Physiological Chemistry*. 7thed. Lange Medical Publ. Los Altos, California.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 113-141
- Salamon S. dan W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77-111
- Salisbury C.W. and VanDemark N.L. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi buatan pada sapi*. Terjemahan Januar, Gadjah Mada University Press Yogyakarta.
- Sunardi. 1989. Karakteristik semen kambing Peranakan Ettawa dan lama daya hidup spermatozoa dalam pengencer kuning telur sitrat. *Buletin Peternakan*. Fakultas Peternakan UGM, 1: 19-22
- Wibowo, C.H. 1997 Pengaruh pencucian sel dan penyimpanan sperma ayam kampung terhadap fertilitas. Tesis S2. Fakultas Peternakan UGM, Yogyakarta.