

Kualitas Semen Beku Babi dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi dengan Trehalosa

(THE QUALITY OF BOAR FROZEN SEMEN IN COMMERCIAL EXTENDER SUPPLEMENTED WITH TREHALOSE)

Tuty Laswardi Yusuf¹, Raden Iis Arifiantini¹,
Reni Ratni Dapawole², Wilmientje Marlene Mesang Nalley³

¹Divisi Reproduksi dan Kebidanan,
Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
Jln Agathis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680
Telp 0251-8623940. Email: Iis.arifiantinipurna@gmail.com
Program Studi Peternakan, Fakultasdan Sains dan Teknologi,
Universitas Kristen Wiracana Sumba
³Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana,
Jl. Adi Sucipto Penfui Kupang, Nusa Tenggara Timur.

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari penambahan trehalosa dalam pengencer *Beltsville Thawing Solution* (BTS) dan MIII terhadap kualitas semen beku babi. Semen dikoleksi dari sembilan ekor babi berumur 5-6 tahun menggunakan teknik *glove hand method*. Semen dievaluasi secara makro dan mikroskopis. Semen yang memiliki spermatozoa motil di atas 70% dengan konsentrasi di atas $200 \times 10^6/\text{mL}$ dibagi ke dalam empat tabung, dua tabung pertama diencerkan dengan BTS dan dua tabung lainnya dengan MIII. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu ruangan ($20-22^\circ\text{C}$) selama dua jam (*holding time*). Semen kemudian disentrifugasi 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* diencerkan kembali. Semen yang disentrifugasi dengan BTS, diencerkan dengan BTS gliserol (BTSg) dan BTS gliserol Trehalosa 100 mM (BTSgT) dan yang disentrifugasi dengan MIII, diencerkan dengan MIIIg dan MIIIgT. Gliserol yang digunakan adalah 4%. Semen yang telah diencerkan dikemas dalam *macrotube* (5 mL), diekuilibrasi pada 5°C selama dua jam. Setelah equilibrasi *macrotube* dibekukan 4 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 20 min dan disimpan dalam container nitrogen cair (-196°C) untuk pengujian lebih lanjut. Setelah penyimpanan 24 jam, terhadap semen beku dilakukan *thawing* pada suhu 52°C selama 45 detik. Hasil penelitian menunjukkan motilitas spermatozoa dalam BTSgT ($30,00 \pm 4,47\%$) paling tinggi ($p < 0,05$) daripada MIIIgT ($26,67 \pm 8,16\%$), BTSg ($24,17 \pm 9,17\%$), atau MIIIg ($21,67 \pm 7,53\%$). Simpulan dari penelitian ini adalah penambahan 100 mM trehalosa dalam pengencer BTSg dapat mempertahankan motilitas spermatozoa babi lebih baik daripada pengencer lainnya.

Kata-kata kunci: trehalosa; semen beku babi; BTS; MIII

Abstract

The aim of the research was to study trehalosa supplementation in *Beltsville Thawing Solution* (BTS) and MIII extender on the quality of frozen boar semen. Semen was collected from nine boars age 5-6 years using *glove hand method*. The semen were then evaluated macro and microscopically. Semen having $>70\%$ sperm motility and $>200 \times 10^6/\text{mL}$ sperm concentration were diluted into two tubes containing BTS and two tubes containing MIII, then kept at room temperature ($20-22^\circ\text{C}$) for 2 hours (*holding time*). Following this the semen were centrifuged at 2000 RPM for 10 minutes and the supernatant was discarded, the pellet was re-diluted with BTS, BTS-Trehalose 100 mM (BTS-T), MIII and MIII-Trehalose 100 mM (MIII-T) with 4% glycerol, packed into 5 ml *macrotube*, equilibrate at 5°C for 2 hours. After equilibration *macrotube* were frozen horizontally 4 cm above the liquid nitrogen vapor for 20 minutes and then submerged in liquid nitrogen (-196°C) for further evaluation. After 24 hours the semen then thawed at 52°C for 45 seconds. The results demonstrated that sperm motility in BTS-T ($30.00 \pm 4.47\%$) was higher ($P < 0.05$) than MIII-T ($26.67 \pm 8.16\%$), BTS ($24.17 \pm 9.17\%$), or MIII ($21.67 \pm 7.53\%$). This research conclude that supplementation of 100 mM trehalose in BTS extender improved motility of boar sperm after freezing and thawing.

Keywords: trehalosa; frozen semen; boar; BTS; MIII

PENDAHULUAN

Di Indonesia inseminasi buatan (IB) pada babi telah dilakukan di beberapa peternakan besar menggunakan semen cair. Penggunaan semen beku untuk IB babi baru dilakukan di beberapa peternakan besar, menggunakan semen beku impor dari Canada dengan harga yang sangat mahal. Penggunaan semen beku memiliki keunggulan antara lain dapat digunakan dalam jangka waktu yang panjang. Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas diperlukan bahan pengencer yang dapat menjamin kebutuhan fisik dan kimia selama proses pendinginan, pembekuan maupun pada saat *thawing*.

Babi mempunyai karakteristik semen yang berbeda dengan ternak lainnya. Memiliki volume yang besar, bisa mencapai 500 mL (Shibley, 1999) dengan konsentrasi yang rendah, hanya 200-300x10⁶ sel/mL (Garner dan Hafez, 2000). Semen babi dikenal mudah mengalami kejutan dingin (*cold shock*) karena kandungan asam lemak dan *phospholipid* yang berbeda dengan ternak lain yaitu komposisi *phosphatidylethanolamine* dan *sphingomyelin* sebanyak 24% dan 14% (Johnson *et al.*, 2000), sehingga preservasi semen cair babi hanya bisa dilakukan pada suhu 18°C sedangkan semen ternak lain pada suhu 5°C.

Kualitas semen beku ditentukan oleh beberapa faktor di antaranya adalah teknik dan peralatan yang digunakan, bahan pengencer serta jenis dan konsentrasi krioprotektan yang ditambahkan. Bahan pengencer untuk semen babi tersedia di pasaran seperti *Beltsville Thawing Solution* (BTS) dan MIII. Pengencer BTS merupakan bahan pengencer berdaya simpan pendek/*short-term* dengan daya tahan 1-3 hari, sedangkan MIII merupakan bahan pengencer berdaya simpan sedang/*medium-term* dengan daya tahan 5-7 hari (Zhou *et al.*, 2004).

Krioprotektan yang umum digunakan pada pembekuan semen mamalia adalah gliserol. Gliserol ini dikenal sebagai krioprotektan intraseluler (Holt, 2000; Watson, 2000). Gliserol dapat melindungi sel spermatozoa pada bagian dalam pada saat pembekuan dari kristal es yang merusak spermatozoa. Konsentrasi gliserol yang digunakan untuk spermatozoa babi adalah 4%

(Buhr *et al.* 2001) dan 6% (Yi *et al.*, 2002). Selain krioprotektan intraseluler juga dikenal krioprotektan ekstraseluler yang dapat melindungi spermatozoa dari pembentukan kristal es di luar sel. Krioprotektan ekstra seluler yang umum ditambahkan dalam pembekuan semen adalah karbohidrat bermolekul besar seperti rafinosa (Yildiz *et al.*, 2000) dan trehalosa (Aisen *et al.*, 2000).

Trehalosa merupakan disakarida yang berperan sebagai membran stabilisator (Ahmad dan Aksoy, 2012) dan dilaporkan dapat meningkatkan kualitas semen beku ternak, di antaranya pada kuda (Arifiantini *et al.*, 2010), anjing (Yildiz *et al.*, 2000), domba (Aisen *et al.*, 2000), kambing (Aboagla dan Terada, 2004; Naing *et al.*, 2010) dan babi (Hu *et al.*, 2009). Molekul trehalosa dapat menyisip di antara *phospholipid* penyusun membran plasma, sehingga meningkatkan fluiditas (kelenturan) membran spermatozoa agar tidak mudah rusak pada saat pembekuan ataupun saat *thawing* (Ahmad dan Aksoy, 2012).

Mengingat membran plasma babi mudah mengalami *cold shock* maka penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pembekuan semen babi menggunakan dua pengencer komersial dengan penambahan trehalosa.

METODE PENELITIAN

Sumber semen berasal dari sembilan ekor babi jantan dari dua ras berbeda (Duroc empat ekor dan Landrace lima ekor) yang telah dewasa kelamin, berumur antara 5-6 tahun dalam kondisi yang sehat. Babi tersebut dipelihara dalam kandang individual yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa pakan yang mengandung protein 18% dan energi 16 kkal, dengan bahan pakan yang terdiri dari dedak padi, dedak jagung, polar, gandum, konsentrat 152, mineral dan probiotik starbio (koloni bibit mikrob yang berasal dari lambung sapi) untuk efisiensi penggunaan ransum dan mengurangi bau kotoran ternak. Total pemberian pakan sebanyak 2,5 kg/ekor/hari, serta air minum yang diberikan secara *ad libitum*.

Penyiapan Bahan Pengencer

Bahan pengencer yang digunakan pada penelitian ini adalah pengencer komersial BTS® dan MIII®. Bahan pengencer terdiri atas

Tabel 1. Komposisi pengencer dasar BTS dan MIII

Bahan	BTS	MIII
BTS (g)	50	-
MIII (g)	-	50
Aquadest <i>ad</i> (mL)	1000	1000

Keterangan: BTS= *Beltsville Thawing Solution*

Tabel 2. Komposisi bahan pengencer semen beku

Bahan	BTSg	BTSgT	MIIIg	MIIIgT
BTS (%)	96	96	-	-
MIII (%)	-	-	96	96
Gliserol (%)	4	4	4	4
Trehalosa (mM)	-	100	-	100

Keterangan : BTSg = Pengencer BTS dengan gliserol 4%, BTSgT = Pengencer BTS dengan gliserol 4%, dan trehalosa 100 mM, MIIIg = pengencer MIII dengan gliserol 4%, MIIIgT = pengencer MIII dengan gliserol 4% dan trehalosa 100 mM

pengencer dasar (Tabel 1) dan pengencer semen beku (Tabel 2) yaitu pengencer dasar BTS atau MIII yang disuplementasi dengan trehalosa 100 mM (konsentrasi terbaik pada penelitian pendahuluan) dengan krioprotektan gliserol 4% (Buhr *et al.*, 2001).

Koleksi dan Evaluasi Semen

Koleksi semen dilakukan satu minggu dua kali menggunakan teknik masase (*glove hand method*) yang dipancing dengan babi-babian/*dummy sow*. Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis meliputi volume semen, derajat keasamaan (pH), konsistensi serta warna. Evaluasi semen secara mikroskopis meliputi persentase motilitas, viabilitas, konsentrasi spermatozoa per mL, dan abnormalitas spermatozoa (Arifiantini, 2012). Semen yang memiliki motilitas di atas 70% dengan konsentrasi di atas 200 juta sel/mL dengan abnormalitas di bawah di bawah 20% digunakan dalam penelitian ini.

Pengolahan Semen

Semen dibagi ke dalam empat tabung. Dua tabung pertama ditambahkan dengan pengencer

dasar BTS dan dua tabung lainnya ditambahkan pengencer dasar MIII dengan perbandingan 1:1. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu ruang (20-22°C) selama dua jam (*holding time*), selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dan *pellet* (spermatozoa) diencerkan kembali sesuai perlakuan. Dua tabung pertama yang disentrifugasi menggunakan pengencer BTS diencerkan menggunakan BTS gliserol (BTSg) dan BTS-gliserol Trehalosa (BTSgT), sedangkan dua tabung lainnya yang disentrifugasi menggunakan pengencer MIII diencerkan menggunakan MIII gliserol (MIIIg) dan MIII gliserol-Trehalosa (MIIIgT).

Semen yang telah diencerkan dikemas dalam *macrotube* 5 mL (Minitüb. Tiefenbach, Germany) kemudian disusun dalam rak pembekuan dan diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama dua jam. Pembekuan dilakukan dalam uap N₂ cair dengan jarak 4 cm dari permukaan N₂ cair selama 20 menit (Yi *et al.*, 2002), semen beku disimpan di dalam kontainer N₂ cair (196°C) untuk pengujian lebih lanjut.

Thawing Semen Beku

Pengujian semen beku dilakukan dengan cara mencairkan kembali semen beku (*thawing*) dalam air hangat (52°C) selama 45 detik. Setelah itu dilakukan pemeriksaan kualitas semen meliputi persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Pengujian Motilitas. Motilitas spermatozoa dinilai dengan cara meneteskan satu tetes semen di atas *object glass* yang telah dihangatkan dan ditutup dengan *cover glass*, kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Persentase motilitas dinilai secara subjektif kuantitatif dengan membandingkan spermatozoa *motil* bergerak ke depan (*progresif*) dan yang tidak progresif pada lima lapang pandang. Penilaian diberikan dari angka 0% (tidak motil) sampai 100% (motil seluruhnya).

Rasio spermatozoa hidup dan mati (viabilitas). Satu tetes semen diwarnai dengan dua tetes pewarna eosin-nigrosin lalu dihomogenkan. Campuran semen dan pewarna dibuat preparat ulas dan difiksasi di atas *heating table*. Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Spermatozoa dihitung minimal 200 sel dari 10 lapang pandang. Spermatozoa yang hidup

ditandai dengan tidak menyerap warna dan yang mati menyerap warna merah pada bagian kepala spermatozoa.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Penelitian dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Peubah yang diamati adalah persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa mulai dari semen segar, *holding time*, sentrifugasi, ekuilibrasi dan setelah *thawing*. Data dianalisis menggunakan sidik ragam atau *analysis of variance* (ANOVA). Jika antar perlakuan ada perbedaan, maka dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1995). Data disajikan dalam rata-rata dan simpangan bakunya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Babi

Semen segar babi secara makroskopis menunjukkan volume semen 254,80±44,50 mL, berwarna putih-krem, pH 6,72±0,10 dengan konsistensi encer. Secara mikroskopis motilitas spermatozoa 76,31±4,80%, konsentrasi spermatozoa 280,20±90,10x10⁶ sel/mL dengan viabilitas spermatozoa 86,00±2,88% dan abnormalitas spermatozoa sebesar 7,15±1,42% (Tabel 3).

Berdasarkan hasil evaluasi semen segar, seluruh semen yang dikoleksi mempunyai kualitas yang baik dan layak untuk diproses menjadi semen beku sesuai dengan karakteristik semen babi yang normal menurut Ax *et al.* (2000) yaitu volume semen babi tanpa gelatin berkisar 200-250 mL, dengan konsentrasi spermatozoa berkisar 200-300x10⁶ sel/mL (Garner dan Hafez, 2000), persentase Tabel 3. Karakteristik semen segar babi

Karakteristik semen	Rataan
Makroskopis	
Volume (mL)	254,80±44,50
Warna	Putih-krem
Konsistensi	Encer
pH	6,72±0,10
Mikroskopis	
Motilitas(%)	76,31±4,80
Konsentrasi (10v /mL)	280,20±90,10
Viabilitas (%)	86,00±2,88
Abnormalitas (%)	7,15±1,42

abnormalitas kurang dari 20% (Johnson *et al.*, 2000).

Kualitas Semen Beku dalam Berbagai Bahan Pengencer

Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Setelah *Holding Time*. *Holding time* sangat diperlukan untuk menurunkan suhu secara bertahap sebelum ekuilibrasi pada suhu 5°C, agar spermatozoa tidak mengalami *cold shock* yang berlebihan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa setelah *holding time* dua jam pada suhu ruangan tidak berbeda antar pengencer dengan motilitas antara 70,83±2,04 sampai dengan 71,67±2,58%. *Holding time* juga tidak memengaruhi viabilitas spermatozoa babi dengan nilai 83,90±2,08 sampai dengan 86,71±2,07% (Tabel 4). Suhu *holding time* pada penelitian ini adalah 20°C, oleh karena UPTD Baturiti, di Baturiti, Tabanan, Bali, tempat dimana penelitian ini dilakukan merupakan dataran tinggi dengan ketinggian 700 mdpl, dengan suhu yang sejuk berkisar antara 20-22°C pada siang hari dan 18-20°C pada malam hari. Suhu tersebut sangat ideal untuk menyimpan semen babi mengingat babi tidak tahan jika disimpan pada suhu yang rendah. Selama ini pada peternakan-peternakan babi penyimpanan semen cair babi dilakukan pada suhu 16-18°C.

Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Setelah Sentrifugasi. Semen babi mempunyai konsistensi yang encer, sehingga untuk mendapat konsentrasi spermatozoa, perlu dilakukan sentrifugasi untuk meningkatkan konsentrasi spermatozoa per mL. Untuk mengurangi kerusakan akibat sentrifugasi diberikan pengencer dasar 1:1. Sentrifugasi menurunkan motilitas spermatozoa antara 2,50 sampai dengan 5,83% dan menurunkan viabilitas spermatozoa antara 1,42 sampai dengan 4,53%.

Penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah sentrifugasi pada penelitian ini relatif kecil. Setelah sentrifugasi spermatozoa dalam pengencer BTSgT menunjukkan motilitas dan viabilitas spermatozoa spermatozoa 69,17±2,04% dan 85,28±2,70%, lebih tinggi (p<0.05) dibandingkan dengan MIIIg, sedangkan MIIIgT dan BTSg menunjukkan kualitas yang sama (Tabel 4)..

Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Setelah Ekuilibrasi. Ekuilibrasi pada ternak

Tabel 4. Motilitas dan viabilitas spermatozoa babi setelah *holding time*, sentrifugasi setelah ekuilibrasi dan setelah *thawing*

Peubah	Perlakuan			
	BTSg	BTSgT	MIIG	MIIGT
-----Setelah holding time-----				
Motilitas	70,83±2,04	71,67±2,58	70,83±2,04	70,83±2,04
Viabilitas	84,21±3,26	86,71±2,07	83,90±2,08	86,35±1,70
-----Setelah sentrifugasi-----				
Motilitas	67,50±2,74 ^{ab}	69,17±2,04 ^a	65,00±4,47 ^b	68,33±2,58 ^{ab}
Viabilitas	81,24±1,96 ^b	85,28±2,70 ^a	80,20±3,33 ^b	81,81±2,77 ^b
-----Setelah ekuilibrasi-----				
Motilitas	62,50±2,74 ^a	63,33±2,58 ^a	57,50±5,24 ^b	62,50±2,74 ^a
Viabilitas	74,27±3,39 ^a	76,61±1,96 ^a	73,61±2,36 ^a	74,27±2,99 ^a
-----Setelah thawing-----				
Motilitas	24,17±9,17 ^{ab}	30,00±4,47 ^a	21,67±7,53 ^b	26,67±8,16 ^{ab}
Viabilitas	69,17±3,62 ^a	70,80±0,70 ^a	68,20±2,06 ^a	70,48±3,05 ^a

Keterangan : huruf superskrip berbeda yang mengikuti angka pada baris yg sama menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

BTSg = Pengencer BTS dengan gliserol 4%, BTSgT = Pengencer BTS dengan gliserol 4%, dan trehalosa 100 mM, MIIG = pengencer MIII dengan gliserol 4%, MIIGT = pengencer MIII dengan gliserol 4% dan trehalosa 100 mM

umumnya dilakukan pada suhu 5°C. Suhu tersebut juga merupakan suhu preservasi untuk semen cair. Semen babi mempunyai suhu preservasi 15-20°C (Paulenz *et al.*, 2000). Ekuilibrasi semen babi pada suhu 5°C menurunkan motilitas spermatozoa antara 5,00 sampai dengan 7,50% dan viabilitas spermatozoa antara 6,59 sampai dengan 8,67%. Spermatozoa dalam pengencer MIIG menunjukkan motilitas spermatozoa 57,50±5,24%, paling rendah ($p < 0,05$) dibandingkan tiga pengencer lainnya. Viabilitas spermatozoa dari keempat pengencer tidak berbeda ($p > 0,05$) dengan nilai antara 62,50±2,74 sampai dengan 63,33±2,58% (Tabel 4).

Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa setelah Thawing. Proses pembekuan dan *thawing*, menyebabkan spermatozoa dua kali melewati suhu kritis yakni minus 60°C sehingga menyebabkan terjadinya penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Pada penelitian ini spermatozoa dalam pengencer BTSgT menunjukkan motilitas 30,00±4,47%, lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan pengencer MIIG 21,67±7,53%. Spermatozoa dalam pengencer BTSg dan MIIGT menunjukkan motilitas yang relatif sama yaitu 24,17±9,17% dan 26,67±8,16% (Tabel 4). Viabilitas

spermatozoa dalam keempat pengencer tidak berbeda dengan kisaran nilai antara 68,20±2,06 sampai dengan 70,80±0,70%.

Kualitas semen beku babi sampai saat ini memang masih rendah dibandingkan semen beku ternak lain. Pada ternak sapi, kualitas semen beku cukup tinggi yaitu 41,53±4,92 sampai dengan 50,21±3,89% (Arifiantini dan Yusuf, 2010), pada kambing 51,2±2,1% (Naing *et al.*, 2010) dan domba 49,0 sampai dengan 58,4% (Bag *et al.*, 2002).

Motilitas spermatozoa *post thawing* adalah 21,67±7,53 sampai dengan 30,00±4,47. Rendahnya motilitas *post thawing* ini kemungkinan berhubungan dengan komposisi asam lemak dan *phospholipid* yang berbeda dengan ternak lain yaitu komposisi *phosphatidylethanolamine* dan *sphingomyelin* sebanyak 24% dan 14% (Jhonson *et al.*, 2000) sedangkan pada membran plasma sapi hanya 9,7% dan 11,5%. Komposisi protein plasma semen dan membran spermatozoa yang bervariasi antar individu juga menyebabkan hilangnya daya gerak dan viabilitas spermatozoa karena pengaruh pembekuan (Zhan *et al.*, 2006).

Kualitas semen beku babi setelah *thawing* menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Motilitas spermatozoa *post thawing* adalah 38 sampai dengan 46±3,5% (Spencer *et al.*, 2010),

46,2±1,3% (Pinho *et al.*, 2014) dan 26,5±1,9 sampai dengan 40,7±1,8% (Fraser *et al.*, 2014). Rendahnya motilitas *post thawing* pada semen beku babi ini disebabkan rusaknya membran plasma pada saat pembekuan dan *thawing*, kerusakan membran tersebut kemungkinan besar terjadi pada bagian ekor terutama pada bagian *midpiece*. *Midpiece* merupakan bagian ekor spermatozoa berperan dalam metabolisme yang menghasilkan energi untuk pergerakan pada bagian mitokondria. Kerusakan membran akibat pembekuan pada bagian tersebut menyebabkan gangguan perombakan *adenosine triphosphat* (ATP) menjadi *adenosinediphosphat* (ADP) ataupun *adenosine monophosphat* (AMP), sehingga energi untuk pergerakan tidak ada. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme mitokondria (Sumardani *et al.*, 2008).

Kerusakan pada bagian membran kepala spermatozoa tidak separah pada bagian ekor, hal ini terlihat dari nilai viabilitas spermatozoa yang masih tinggi berkisar antara 68,20±2,06 sampai dengan 70,80±0,70% (Tabel 4), dan tidak ada perbedaan viabilitas spermatozoa dari empat pengencer yang digunakan. Tingginya nilai viabilitas spermatozoa dibandingkan motilitas spermatozoa pada penelitian ini membuktikan bahwa trehalosa mampu melindungi membran plasma spermatozoa selama pembekuan. Secara deskriptif viabilitas spermatozoa pada pengencer yang disuplementasi trehalosa adalah 70,80±0,70% dan 70,48±3,05% dibandingkan tanpa trehalosa 68,20±2,06% dan 69,17±3,62%. Hal ini juga terlihat bahwa pada pengencer yang disuplementasi trehalosa menunjukkan motilitas spermatozoa 30,00±4,47% dan 26,67±8,16% sedangkan tanpa trehalosa hanya 21,67±7,53% dan 24,17±9,17%. Trehalosa bekerja dengan cara menyisip pada membran plasma spermatozoa menjadikan membran lebih lentur sehingga pada saat pembekuan dan *thawing* tidak mudah rusak. Menurut Aisen *et al.*, (2000) dan Bucak dan Tekin, (2007), trehalosa dapat meningkatkan integritas membran plasma dan viabilitas semen domba.

Pada penelitian ini penurunan motilitas spermatozoa terjadi pada semua tahap pembekuan, tetapi penurunan yang tinggi adalah pada saat ekuilibrisasi ke *post thawing*. Tanpa melihat jenis pengencer yang digunakan, pengencer yang disuplementasi trehalosa menunjukkan penurunan yang lebih rendah antara 33,33 sampai dengan 35,83%, jika tanpa penambahan trehalosa penurunannya lebih tinggi antara 35,83 sampai dengan 38,33%. Dari

hasil tersebut terlihat bahwa spermatozoa mengalami kerusakan pada saat pembekuan dan *thawing*. Kerusakan tersebut kemungkinan akibat belum optimalnya krioprotektan yang melindungi membran pada saat pembekuan, sehingga perlu dicari kombinasi krioprotektan intra dan ekstraseluler yang lebih tepat.

SIMPULAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa pengencer terbaik untuk pembekuan semen babi adalah pengencer BTS yang disuplementasi trehalosa 100 mM.

SARAN

Disarankan untuk menguji fertilitas semen beku dengan pengencer BTS yang disuplementasi trehalosa ternak babi yang ada di lapangan (peternak).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Bali, atas izin dan fasilitas penelitian. Terimakasih kepada seluruh staf di Unit Pelaksana Teknis Daerah Baturiti yang telah banyak membantu selama penelitian diselenggarakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.
- Ahmad E, Aksoy M. 2012. *Trehalose as a cryoprotective agent for the sperm cells: amini review*. Department of Reproduction and Artificial Insemination. Faculty of Veterinary Medicine Ayдын. Turkey. Adnan Menderes University. 09016.
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- Arifiantini RI, Yusuf TL. 2010. Developing of tris soy milk diluent for frisian holstein bull frozen semen. *Hayati* 17(2): 91-94.

- Arifiantini RI. 2012. *Teknik koleksi dan evaluasi semen pada hewan*. Bogor. IPB press.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Semen evaluation. In: *Reprod in Farm Anim*. Hafez B. Hafez ESE (Ed). 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. Hlm. 365-389.
- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. 2002. Effect of freezing temperature at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 72: 175-183.
- Bucak MN, Tekin N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rum Re*. 73:103-108.
- Buhr MM, Fiser P, Bailey M, Curtis FE. 2001. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Androl* 22: 961-969.
- Fraser L, J Strzezek, WK Kordan. 2014. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Anim Reprod Sci* <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.04.010>.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B. Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. Hlm. 96-109.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
- Hu JH, Li QW, Li G, Jiang ZL, Bu SH, Yang H, Wang LQ. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Anim Reprod Sci* 112: 107-118.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of Boar Semen. *J Anim Sci* 62: 143-172.
- Naing SW, Wahid H, Azam KM, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhal S, Bukar MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of sugars on characteristics of Boer goat semen after cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 122: 23-28.
- Paulenz H, Kommisrud E, Hofmof PO. 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Anim Reprod Dom* 35: 83-85.
- Pinho RO, Lima DMA, Shiomic HH, Siqueira JB, Silva HT, Lopes PS, Guimarães SEF, Guimarães JD. 2014. Effect of different cryoprotectants on the viability of frozen/thawed semen from boars of the Piau breed. *Anim Reprod Sci* 146: 187-192.
- Shipley CF. 1999. Breeding soundness examination of the boar. *Swine Health Prod* 7(3): 117-120.
- Spencer KW, Purdy PH, Blackburn HD, Spiller SF, Stewart TS, Knox RV. 2010. Effect of number of motile, frozen-thawed boar sperm and number of fixed-time inseminations on fertility in estrous-synchronized gilts. *Anim Reprod Sci* 121: 259-266.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. Prinsip dan prosedur statistik: Suatu Pendekatan biometrik. Sumantri B. penerjemah. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama.
- Sumardani NLG, Yusuf TL, Siagian PH. 2008. Viabilitas Spermatozoa Babi dalam Pengencer BTS (*Beltsville Thawing Solution*) yang dimodifikasi pada Penyimpanan Berbeda. *Media Peternakan* 31(2): 81-86.
- Watson PF. 2000. The caused of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
- Yi JK, Ko HJ, Lee HS, Yang BC, Park CS. 2004. In vitro fertilization and development of pig oocytes inseminated with boar sperm washing media after thawing of the frozen straw. *Asian-Aus J Anim Sci* 17(2):164-167.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.
- Zahn FS, Papa FO, Melo CM. 2006. Blood serum. Seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallion; are they correlated to semen freezability? *Anim Reprod Sci* 94: 64-66.
- Zhou JB, Yuek KZ, Luo MJ, Chang ZL, Liang H, Wang ZY, Tan JH. 2004. Effect of extender and temperatures on sperm viability and fertility capacity of Harbin white boar semen during long-term liquid storage. *Asian Austr J Anim Sci* 17(11): 1501-1508.