

Kualitas Semen Segar Sapi Bali Umur Produktif dan Non-produktif serta Penentuan Konsentrasi Krioprotektan dalam Pengencer Tris Kuning Telur

(FRESH SEMEN QUALITY OF BALI BULL IN PRODUCTIVE AND NON-PRODUCTIVE AGES AND DETERMINATION OF CRYOPROTECTANT CONCENTRATION IN TRIS EGGYOLK EXTENDER)

Anna Nabilla^{1,3}, Raden Iis Arifiantini², Bambang Purwantara²

¹Program Studi Biologi Reproduksi,
Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor,

²Divisi Reproduksi dan Kebidanan,
Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, IPB,
Jl Agatis, Kampus IPB, Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia, 16880.

³Laboratorium Prosesing Semen Sapi Bali,
UPT Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Baturiti,
Jalan Raya Bedugul Km 43, Baturiti,
PO. BOX 82191, Tabanan, Bali, Indonesia

Email: iis.arifiantinipurna@gmail.com; annanabilla@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah membandingkan kualitas semen sapi bali pada kelompok umur produktif (di bawah 10 tahun) dengan kelompok umur lewat produktif (di atas 10 tahun) dan mengevaluasi kualitas semen beku sapi bali setelah kriopreservasi dalam pengencer Tris kuning telur menggunakan *dimethylformamide* (DMF) dan gliserol pada tiga konsentrasi (5%, 6%, dan 7%). Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dan dievaluasi secara makro dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis dilakukan secara visual dan mikroskopis menggunakan *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA). Setelah dievaluasi semen dibagi ke dalam enam tabung masing-masing diencerkan dengan Tris kuning telur (TKT) menggunakan gliserol 5% (TKTG₅), TKT-gliserol 6% (TKTG₆), TKT-gliserol 7% (TKTG₇), TKT-DMF 5% (TKTD₅), TKT-DMF 6% (TKTD₆) dan TKT-DMF 7% (TKTD₇). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada semua peubah kecuali volume semen. Volume semen kelompok produktif lebih tinggi daripada kelompok umur lewat produktif. Tidak terdapat perbedaan motilitas spermatozoa *post thawing* dalam pengencer TKT-Gliserol 5% dengan TKT-DMF 5,6 dan 7%. Nilai *recovery rate* spermatozoa paling tinggi ditunjukkan oleh spermatozoa dalam pengencer TKT dengan DMF 5% dan DMF 6% ($63,33 \pm 2,40$ dan $68,67 \pm 2,33$). Dapat disimpulkan bahwa kualitas semen sapi bali tidak berbeda antar kelompok produktif dengan kelompok umur lewat produktif dan kualitas semen *post thawing* dalam pengencer TKT 5-7% DMF atau 5% gliserol sama baiknya.

Kata-kata kunci: semen; sapi bali; DMF; gliserol; umur

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the quality of Bali bull fresh semen in productive group (below 10 years old) with over productive group and to evaluate the frozen semen quality of bali bull after cryopreservation in Tris egg yolk extender using *Dimethyl formamide* (DMF) and glycerol in three different concentrations (5%, 6%, and 7%). Semen was collected using artificial vagina. Semen then evaluated macro and microscopically. Macroscopic evaluation conducted visually and microscopic evaluation with the aid of *Computer Assisted Sperm Analysis* CASA. Immediately after evaluation, semen were divided into six aliquots and diluted with Tris egg yolk (TEY) glycerol 5% (TEYG₅), TEY-glycerol 6% (TEYG₆), TEY

glycerol 7% (TEYG₇), TEY-DMF 5% (TKTD₅), TEY-DMF 6% (TEYD₆) and TEY-DMF 7% (TKTD₇). Results of experiment showed that there was no difference ($P>0.05$) among the all parameters, except for semen volume. Semen volume of productive group was higher than over productive age group. No difference was found in post thawing motility of the spermatozoa in TEY extender with 5% glycerol, and TEY with 5%, 6% and 7% DMF. The higher recovery rate of bali bull spermatozoa demonstrated by spermatozoa in TEY extender with glycerol 5% and DMF 6% (63.33 ± 2.40 dan 68.67 ± 2.33). It was concluded that bali bull semen quality did not differ between productive and over productive ages and post thawing semen quality of bali bull in TEY with 5-7% DMF or 5% glycerol was not also different.

Keywords : Bali bull; semen quality; DMF; glycerol

PENDAHULUAN

Sapi bali merupakan salah satu rumpun sapi yang penting dalam perkembangan industri peternakan di Indonesia dan sumber daya genetik sapi lokal yang memiliki potensi unggul. Sapi bali memiliki potensi genetik yang baik dan menguntungkan untuk dikembangkan karena konsumen memiliki minat yang baik terhadap presentase karkasnya yang tinggi (Purwantara *et al.* 2012). Perkembangbiakan sapi bali sebagian dilakukan dengan teknik inseminasi buatan (IB) menggunakan semen beku yang diproduksi di beberapa Balai Inseminasi Buatan (BIB).

Undang-Undang Nomor 41 Tahun 2014 yang merupakan perubahan atas Undang-Undang nomor 18 Tahun 2009 tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan diamankan dalam Pasal 13 ayat (6), bahwa setiap benih atau bibit yang beredar wajib memiliki sertifikat benih atau bibit yang memuat keterangan mengenai silsilah dan ciri-ciri keunggulannya. Oleh karena itu hasil produksi semen beku yang didistribusikan harus sesuai dengan SNI semen beku sapi. Sertifikasi produk benih dan bibit ternak dilakukan oleh lembaga sertifikasi produk (LsPro) benih dan bibit ternak, Kementerian Pertanian. Salah satu persyaratannya adalah, semen beku dihasilkan oleh pejantan yang mempunyai sertifikat dan umur produktif dengan umur maksimal 10 tahun.

Sapi bali merupakan sapi lokal yang kemungkinan mempunyai potensi reproduksi yang berbeda dibandingkan sapi-sapi eksotik seperti sapi *simmental* dan *limousin*. Potensi reproduksi termasuk umur produktif sapi bali perlu diteliti sehingga untuk sapi-sapi lokal umur produktif dalam menghasilkan semen beku dapat dibedakan dengan sapi eksotik, sehingga umur akhirnya di BIB juga berbeda. Potensi genetik yang unggul harus disertai teknis produksi semen beku yang baik. Proses pembekuan akan menurunkan kualitas semen

hingga 50% dari kondisi semen segar dan semen yang bertahan memiliki fertilitas rendah. Penggunaan pengencer yang tepat turut menentukan kualitas semen beku (Ariantie *et al.*, 2013).

Penurunan kualitas semen terjadi pada saat produksi semen beku dan dapat diatasi dengan memanipulasi pengencer yang digunakan. Pengencer yang saat ini digunakan untuk sapi bali adalah pengencer komersial berbahan dasar *soya lesitin* dan Tris kuning telur (Arifiantini dan Purwantara, 2010). Tris kuning telur (TKT) memiliki kandungan yang relatif lengkap seperti Tris (*hydroxymethylaminometan*), asam sitrat, dan fruktosa. Fruktosa merupakan gugus gula sederhana dengan bobot molekul kecil seperti glukosa dan umum digunakan sebagai sumber karbohidrat sebagai penyedia energi untuk menjalankan fungsi fisiologi sel dalam proses kriopreservasi (Naing *et al.*, 2010). Komponen-komponen dalam TKT dapat menjaga stabilitas pH, mempertahankan tekanan osmotik, menjaga keseimbangan elektrolit, mengikat butir-butir lemak, sumber energi, serta melindungi sel spermatozoa dari *cold shock* (Herdiawan, 2004).

Spermatozoa juga membutuhkan krioprotektan, yakni bahan untuk mengurangi kerusakan sel pada saat pembekuan. Krioprotektan yang umum digunakan adalah gliserol. Berbagai jenis amida telah digunakan sebagai krioprotektan pada tahun 2000an, salah satunya *dimethylformamide* (DMF) pada ternak kuda (Osorio *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, 2011), pada ternak kambing (Moustacas *et al.*, 2011; Ariantie *et al.*, 2013). Krioprotektan DMF mempunyai bobot molekul yang lebih kecil daripada gliserol, sehingga daya penetrasinya lebih baik. Bobot molekul DMF adalah 73,09 g/mol sedangkan gliserol adalah 92,09382 g/mol (Ball dan Vo, 2001). Krioprotektan yang ideal harus memiliki bobot molekul yang rendah dengan dengan *water solubility* yang tinggi dan toksisitas yang rendah (Medeiros *et al.*, 2002)

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk membandingkan kualitas semen sapi umur produktif lewat umur produktif dan membandingkan kualitas semen beku sapi bali dalam pengencer Tris dengan berbagai konsentrasi gliserol dan DMF.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari-Maret 2017 di Laboratorium *Processing* Semen Sapi Bali, Unit Pelaksana Teknis (UPT), Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Baturiti, Tabanan, Bali.

Sumber Semen

Semen berasal dari sapi bali dengan kelompok pejantan umur produktif 4-9 tahun (di bawah 10 tahun) dan kelompok pejantan umur lewat produktif 10-14 tahun (di atas 10) masing-masing terdiri dari tiga ekor. Sapi dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan diberikan 5 kg/ekor/hari dan hijauan 50 kg/ekor/hari. Pakan dan minum diberikan pada pagi dan sore hari, dan diimbui kecambah 1 kg/ekor/minggu. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

Kualitas Semen Segar dan Beku

Penelitian dibagi menjadi dua tahap. Tahap I, membandingkan kualitas semen segar sapi bali umur produktif dengan sapi bali yang lewat umur produktif. Tahap II menguji konsentrasi gliserol dan DMF terbaik dalam pengencer Tris kuning telur (TKT) untuk pembekuan semen sapi bali.

Tahap 1. Membandingkan kualitas semen segar sapi bali umur produktif dengan sapi bali yang lewat umur produktif. Tahap I menggunakan data sekunder BIBD Baturiti tahun 2016 dan data primer bulan Februari sampai Maret 2017. Data kualitas semen tahun 2016, ditabulasi, peubah yang diamati adalah kualitas makroskopis (volume, warna, konsistensi, dan pH semen) dan mikroskopis (gerakan massa, motilitas dan konsentrasi spermatozoa). Data ditabulasi, dicari rataan dan *standard error means* (SEM).

Koleksi semen. Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dari dua kelompok sapi umur produktif dan kelompok sapi umur lewat produktif dengan frekuensi penampungan dua kali/ekor/minggu dan dilakukan oleh *bull*

master. Penampungan dilakukan jam 8.00-10.00 WITA.

Evaluasi Semen. Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis mengacu pada Baracaldo *et al.* (2007), Arifiantini dan Purwantara (2010), dan Arifiantini (2012). Evaluasi makroskopis yaitu volume semen (mL), diamati dengan melihat skala yang tertera pada tabung penampung. Warna dilihat secara visual. Konsistensi diamati dengan cara memiringkan tabung penampung semen, kemudian ditegakkan kembali ke posisi semula, kriteria penilaian adalah kental, sedang, dan encer. Derajat keasaman (pH) semen diukur menggunakan pH *special indicator paper*.

Evaluasi mikroskopis meliputi gerakan massa, dan skor gerakan individu, spermatozoa hidup dan mati (viabilitas) dan morfologi spermatozoa dengan pewarna *eosin nigrosin* menggunakan mikroskop (Olympus CH21) yang dilengkapi dengan *heating table*. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan *photometer* SDM 6. Evaluasi gerakan motilitas dilakukan menggunakan *Computerized Assisted Sperm Analysis* (Sperm vision, Minitub, Germany).

Tahap 2. Pengujian konsentrasi gliserol dan DMF terbaik dalam pengencer Tris-kuning telur (TKT) untuk pembekuan semen sapi bali.

Persiapan bahan pengencer. Tahap 2, menggunakan pengencer TKT yang terbuat dari 3,03 g Tris-*hydroxymethyl-aminomethane*, 1,78 g asam sitrat dan 1,25 g fruktosa, dilarutkan dalam 100 mL aquadest (Arifiantini dan Purwantara, 2010). Bahan pengencer semen beku terdiri atas enam macam yaitu TKT dengan tiga konsentrasi gliserol dan TKT dengan tiga konsentrasi DMF (Tabel 1).

Pengolahan Semen. Semen dikoleksi dan dievaluasi seperti pada Tahap I. Semen yang diproses menjadi semen beku adalah jika memiliki motilitas di atas 70% dengan konsentrasi spermatozoa di atas 1000 juta/mL. Semen dibagi ke dalam enam tabung masing-masing diencerkan dengan TKT₅, TKTG₆, TKTG₇, TKTD₅, TKTD₆, dan TKTD₇. Semen yang telah diencerkan dikemas dalam straw 0,25 mL kemudian diekuilibrasikan selama 4 jam pada suhu 5°C, setelah itu dibekukan di atas uap N₂ cair sesuai prosedur di Balai Inseminasi Buatan Baturiti.

Evaluasi Semen *Post thawing*. Semen di *thawing* dalam penangas air atau *waterbath* (suhu 37°C) kemudian dilakukan pengamatan terhadap motilitas spermatozoa (%), viabilitas

Tabel 1. Bahan pengencer semen beku sapi bali Tahap 2

Bahan	Pengencer semen					
	TKTG ₅	TKTG ₆	TKTG ₇	TKTD ₅	TKTD ₆	TKTD ₇
Buffer Tris (%)	76	75	74	76	75	74
Kuning telur (%)	20	20	20	20	20	20
Gliserol (%)	5	6	7	-	-	-
DMF (%)	-	-	-	5	6	7
Penisilin (IU mL ⁻¹)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Streptomisin (mg ml ⁻¹)	1	1	1	1	1	1

Keterangan: TKTG₅ = TKT+gliserol 5%; TKTG₆ = TKT+gliserol 6%; TKTG₇ = TKT+gliserol 7%; TKTD₅ = TKT+DMF 5%; TKTD₆ = TKT+DMF 6%; TKTD₇ = TKT+DMF 7%;

spermatozoa (%), membran plasma utuh spermatozoa (%) dan menghitung *recovery rate* dengan rumus $RR = (\text{motilitas spermatozoa post thawing}) \times (\text{motilitas spermatozoa segar})^{-1} \times 100\%$.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian dan analisis data pada Tahap I menggunakan uji-t sampel berpasangan dan Tahap 2 menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua jenis krioprotektan (gliserol dan DMF) masing-masing tiga konsentrasi, dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel and Torrie 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Sapi Bali Umur Produktif dan Lewat Produktif

Secara makroskopis semen segar sapi bali dari kedua kelompok umur produktif dan tidak produktif tidak menunjukkan perbedaan, kecuali untuk peubah volume. Volume semen kelompok umur produktif lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan dengan volume semen kelompok umur lewat produktif (Tabel 3). Ada perbedaan warna semen sapi bali secara visual. Kelompok umur produktif berwarna putih susu sampai krem, namun pada umur lewat produktif putih susu. Secara mikroskopis, gerakan massa, skor individu, viabilitas, konsentrasi spermatozoa per mL dan konsentrasi spermatozoa per ejakulat serta morfologi spermatozoa menunjukkan nilai yang hampir sama, tidak terdapat perbedaan antar parameter yang diuji.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pejantan yang telah memasuki umur lewat produktif masih memiliki kemampuan dalam

menghasilkan semen dengan kualitas yang sama dengan sapi umur produktif, namun dengan volume yang lebih rendah. Penurunan volume semen pada sapi lewat umur produktif diduga akibat jaringan organ reproduksi yang telah mengalami degenerasi. Vilakazi dan Webb (2004) menyatakan bahwa jaringan testikuler sapi FH berumur tua mengalami degenerasi yang memengaruhi kualitas dan kuantitas semen yang dihasilkan. Berbedanya volume semen tidak memengaruhi jumlah produksi semen beku, karena jumlah spermatozoa per ejakulat dari kedua kelompok umur tersebut sama. Volume semen sebenarnya juga dipengaruhi oleh *teasing* yang dilakukan oleh *bull master*. *Teasing* dilakukan dengan cara melakukan *false mount* beberapa kali. Secara fisiologis jantan pada saat *teasing* akan dirangsang melakukan emisi dan transportasi spermatozoa dari epididimis ke ampulla duktus deferens (Senger, 2005) sehingga kualitas semen dan termasuk volume semen menjadi optimal.

Sapi umur produktif memiliki organ reproduksi yang telah berkembang sempurna sehingga semen yang dihasilkan memiliki kualitas dan kuantitas yang optimal (Balic *et al.*, 2012). Penelitian yang membandingkan kualitas semen dari umur produktif dan umur non produktif jarang dilakukan. Neto *et al.* (2013) melaporkan semen dari kuda tua memiliki kualitas yang sama dengan kuda muda dan dewasa. Hal ini menunjukkan bahwa pada kuda tua masih terjadi proses spermatogenesis dan fungsi termoregulasi yang masih baik. Kualitas semen yang dihasilkan dari kedua kelompok umur dalam penelitian ini termasuk normal, meskipun lebih rendah dari hasil penelitian Arifiantini *et al.* (2006) yang melaporkan rata-rata volume semen sapi bali

sebesar 6,30±1,80 mL dengan konsentrasi 1.340±447,85 juta spermatozoa per mL.

Karakteristik motilitas pada kedua kelompok umur yang dievaluasi menggunakan CASA menunjukkan tidak berbeda (P>0,05). Motilitas total, motilitas progresif, *immotile*, *linearity*, *straightness*, *wobble*; *beat cross frequency*; *amplitude of lateral displacement* disajikan pada Tabel 4.

Menurut Katebi *et al.* (2005), LIN adalah indikator motilitas progresif yang berperan dalam karakteristik fungsi spermatozoa, STR adalah *swimming pattern*. WOB adalah goyangan spermatozoa terkuat per detik,

sehingga berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa kelompok umur produktif memiliki kemampuan fertilisasi yang sama baiknya dibandingkan kelompok umur lewat produktif. Spermatozoa dinilai bergerak secara linear lurus ke depan jika menunjukkan nilai STR di atas 50 dan LIN di atas 35 (Minitube, 2004), maka dari hasil penelitian ini diketahui bahwa spermatozoa kedua kelompok umur bergerak secara linear.

Frekuensi gerakan spermatozoa per menit disebut BCF sehingga dapat diketahui bahwa frekuensi gerakan kelompok umur produktif tidak berbeda dibandingkan kelompok umur

Tabel 3. Karakteristik semen segar sapi bali (rerata±SEM)

Peubah	Kelompok umur	
	Umur produktif	Umur lewat produktif
Makroskopis (n=123)		
Volume (mL)	6,44±0,23a	5,44±0,12b
Warna	Putih susu-krem	Putih susu
Konsistensi	Sedang	Sedang
pH	6,4±1,37	6,4±0,01
Mikroskopis		
Gerakan massa (n=123)	3,33±0,02	3,30±0,03
Gerakan individu (n=9)	2,89±0,16	3,82±0,25
Konsentrasi spermatozoa (10 ⁶ sel mL ⁻¹) (n=123)	1 169,05±92,94	1 253,47±33,87
Viabilitas spermatozoa (%)	78,17±3,48	72,67±4,28
Konsentrasi per ejakulat (10 ⁶ sel)	7404,94±719,39	6829,76±219,2

n 123 (data sekunder dan data primer); n 9 (data primer)

Tabel 4. Karakteristik motilitas spermatozoa sapi bali menggunakan *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA)

Parameter	Umur sapi	
	Produktif	Lewat produktif
<i>Total motility</i> (%)	93,8±1,69	91,69±2,13
<i>Progressive Motility</i> (%)	88,28±2,51	83,06±3,11
<i>Immotile</i> (%)	6,41±1,58	8,18±1,76
LIN (%)	50,00±0,03	49,00±0,02
STR (%)	83,00±0,01	81,00±0,009
WOB (%)	61,00±0,019	60,00±0,018
BCF (beats/s)	31,49±0,63	29,90±1,51
ALH (µm)	6,54±0,21	6,32±0,27

Keterangan: Immotile= Spermatozoa tidak bergerak; LIN = Linearity; STR= Straightness; WOB= Wobble; BCF= Beat cross frequency; ALH= Amplitude of lateral displacement of the sperm head.

lewat produktif. Salah satu indikator gerakan hiperaktif dari spermatozoa adalah ALH. Nilai ALH di atas 7 μ m menandakan spermatozoa tersebut hiperaktif (Marquez dan Suarez, 2007). Gerakan spermatozoa sapi bali pada kedua kelompok umur tidak menunjukkan hiperaktif. Spermatozoa sapi bali hasil evaluasi menggunakan CASA pada penelitian ini menunjukkan karakteristik yang normal. Motilitas total dan motilitas progresif linier berkaitan erat dengan daya tahannya terhadap pembekuan dan tingkat fertilitas yang dilihat dari angka *non-return rate* (Kathiravan et al., 2010).

Kualitas Semen Beku dalam TKT dengan Gliserol dan DMF

Motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi dalam pengencer TKT dengan konsentrasi DMF 5%, 6%, dan 7% menunjukkan, nilai yang hampir sama, ketiganya lebih tinggi dibandingkan spermatozoa dalam TKT dengan berbagai konsentrasi gliserol. Pada Tabel 5 disajikan kualitas spermatozoa setelah ekuilibrasi dan setelah *thawing* dalam pengencer TKT dengan berbagai konsentrasi gliserol dan DMF. Motilitas spermatozoa setelah *thawing* dalam pengencer TKT dengan berbagai konsentrasi DMF dan gliserol 5% menunjukkan nilai yang sama, keempatnya lebih tinggi daripada TKTG₇.

Penggunaan DMF lebih mampu melindungi spermatozoa daripada gliserol pada saat proses pembekuan, kemungkinan disebabkan daya krioprotektif terhadap spermatozoa lebih tinggi. Pertimbangan pemilihan krioprotektan selain harus memiliki kemampuan melindungi

spermatozoa pada saat pembekuan juga harus memiliki bobot molekul yang kecil agar mudah penetrasi ke dalam sel sehingga toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi dapat diminimalisir.

Viabilitas spermatozoa dalam pengencer TKTD₅TKTG₇, tidak berbeda (P>0,05) keduanya lebih tinggi daripada TKTD₇. Tidak terdapat perbedaan viabilitas antara TKTD₅, TKTG₇, TKTD₆, TKTG₆, dan TKTG₅, demikian juga antara TKTD₅, TKTD₇, TKTD₆ TKTG₆, dan TKTG₅. Keutuhan membran plasma spermatozoa tidak berbeda pada seluruh konsentrasi gliserol ataupun DMF dengan nilai antara 77,72% sampai dengan 82,16%.

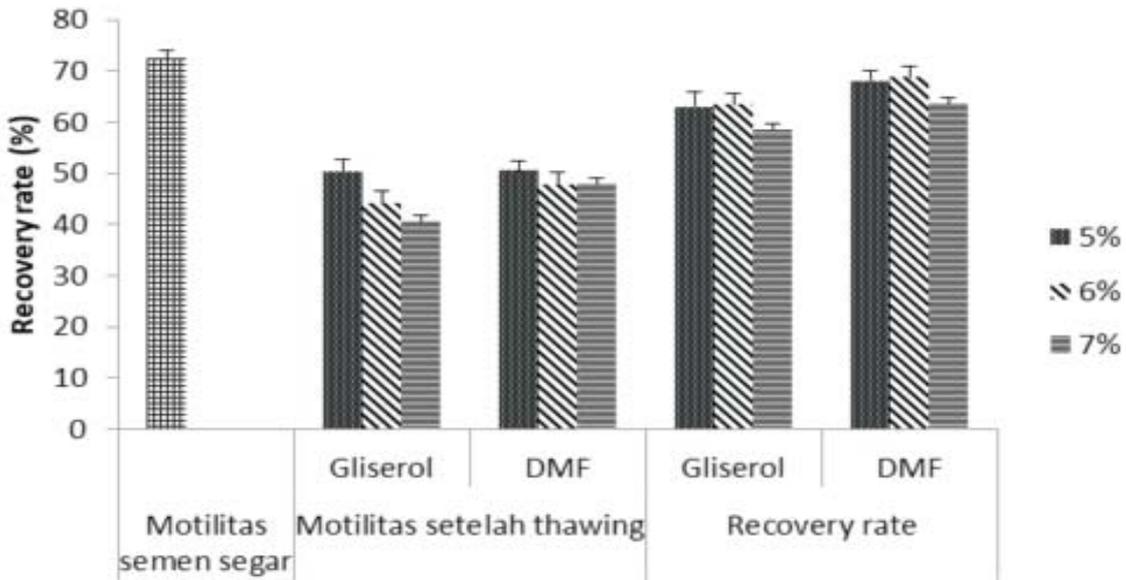
Motilitas setelah *thawing* secara keseluruhan lebih rendah dibandingkan motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi. Hal ini disebabkan proses pembekuan menyebabkan spermatozoa kehilangan kemampuan untuk bergerak akibat rusaknya membran sel. Membran plasma yang masih utuh memberikan korelasi positif terhadap motilitas dan viabilitas karena transpor ion tetap berlangsung dan proses metabolisme sel dapat berjalan dengan baik. Kerusakan membran plasma dapat terjadi pada bagian kepala dan bagian ekor. Kerusakan bagian kepala menyebabkan penurunan viabilitas, kerusakan bagian ekor terutama pada bagian *midpiece* akan berakibat hilangnya kemampuan mitokondria menghasilkan ATP terhambat sehingga energi untuk pergerakan tidak terbentuk dan spermatozoa berhenti bergerak (Arifiantini dan Yusuf, 2010).

Pada tahap kriopreservasi yaitu pengenceran, pendinginan dan pembekuan terjadi perubahan tekanan osmotik dan

Tabel 5. Kualitas semen sapi bali setelah dibekukan dalam pengencer TKT dengan berbagai konsentrasi gliserol dan DMF

Parameter	Pengencer					
	TKTG ₅	TKTG ₆	TKTG ₇	TKTD ₅	TKTD ₆	TKTD ₇
SS						
Motilitas (%)	72,44					
SE						
Motilitas (%)	65,33±1,97ab	67,00±1,01bc	63,83±1,00a	70,16±0,9d	69,00±0,30cd	68,80±0,30cd
ST						
Motilitas (%)	50,22±2,60b	44,05±2,47ab	40,72±2,20a	50,44±1,90b	47,83±1,30b	48,00±2,17b
Viabilitas (%)	57,11±2,74ab	57,05±2,16ab	58,89±2,81b	59,5±2,00b	58,83±2,40ab	51,16±2,20a
MPU (%)	82,16±3,76	79,11±4,54	77,72±5,37	81,16±4,13	77,77±5,01	80,33±4,48

Keterangan: Huruf berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05). SS = Semen segar, SE = Setelah ekuilibrasi, ST = Setelah *thawing*, MPU=membran plasma utuh



Gambar 1. *Recovery rate* spermatozoa dalam pengencer TKT dengan berbagai konsentrasi krioprotektan gliserol dan DMF

perubahan suhu yang ekstrim. Perubahan-perubahan tersebut berpotensi merusak membran plasma dan akrosom spermatozoa yang pada akhirnya akan berpengaruh pada penurunan viabilitas spermatozoa (Bag *et al.*, 2002). Hasil penelitian menunjukkan secara keseluruhan penggunaan gliserol dan DMF dalam pengencer TKT mampu menjaga motilitas spermatozoa sapi bali setelah *thawing*. Pada Tabel 5 disajikan nilai motilitas spermatozoa lebih dari 40% (Batas minimal SNI semen beku sapi), sehingga semen beku dalam pengencer dan krioprotektan ini layak untuk digunakan IB. Pengencer TKT berbahan dasar buffer *Tris (hydroxymethyl) aminomethane* memiliki kemampuan melindungi spermatozoa pada saat pembekuan dengan menjaga keseimbangan intraseluler dan ekstraseluler sehingga proses metabolisme sel tetap berlangsung dan kematian sel berkurang.

Penggunaan DMF pada pembekuan berbagai semen telah dilaporkan. Pada semen babi menggunakan pengencer *Beltville thawing solution* (BTS) konsentrasi DMF terbaik adalah 5% (Bianchi *et al.*, 2008). Konsentrasi terbaik pada semen kuda adalah 2,5% (Pukazhenth *et al.*, 2014). Konsentrasi terbaik pada semen domba dalam pengencer skim soya adalah 6% (Jerez *et al.*, 2016). Penggunaan DMF untuk pembekuan semen anjing menurut Lopes *et al.* (2009) tidak lebih baik dibandingkan gliserol. Pembekuan semen sapi menggunakan DMF

masih jarang dilakukan. Oh *et al.* (2012) melaporkan pembekuan semen sapi *Korean Jeju Black* dalam pengencer Tris kuning telur yang diberi DMF 5% sama baiknya dengan yang diberi gliserol 7%.

Salah satu parameter keberhasilan kriopreservasi pada semen adalah nilai *Recovery rate* (RR). *Recovery rate* merupakan kemampuan spermatozoa pulih dari pembekuan. Nilai RR dari spermatozoa dalam pengencer TKT dengan berbagai konsentrasi krioprotektan disajikan pada Gambar 1. Nilai RR tertinggi ditunjukkan oleh spermatozoa dalam pengencer TKT dengan gliserol dan DMF 6% (63,33±2,40 dan 68,67±2,33). *Recovery rate* dapat digunakan sebagai indikator kemampuan pengencer dan krioprotektan yang mampu menjaga sel spermatozoa selama proses kriopreservasi. Nilai RR pada spermatozoa sapi pasundan dalam pengencer Tris adalah 59,62±5,57 (Baharun *et al.*, 2017). Spermatozoa sapi *limousin*, *simmmental* dan FH dalam pengencer skim kuning telur mempunyai nilai RR berturut-turut adalah 58,87±6,37; 56,27±7,08; 58,87±5,31 (Komariah *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil penelitian, semen sapi bali dari pejantan yang berumur di atas 10 tahun, masih menunjukkan kualitas semen yang baik, sehingga dapat diusulkan untuk memperpanjang masa penggunaan pejantan sapi bali sebagai sumber semen beku agar dapat dibedakan dengan sapi bangsa lain.

Krioprotektan gliserol 5% dan DMF 5%, 6%, dan 7% dalam pengencer TKT sama-sama menghasilkan semen beku dengan kualitas yang baik.

SIMPULAN

Kualitas semen segar sapi bali pada kelompok umur produktif dan umur lewat produktif tidak berbeda kecuali, pada volume semen. Kualitas semen beku sapi bali dalam pengencer TKT pada konsentrasi gliserol 5%, DMF 5%, 6%, dan 7% menunjukkan hasil yang sama, lebih baik dari gliserol 6 dan 7%.

SARAN

Perlu dipertimbangan dalam peraturan afkir sapi bali lebih panjang dari sapi eksotik. Alternatif penggunaan DMF sebagai pengganti krioprotektan gliseroldi BIB perlu dipertimbangkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Kepala Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan, Provinsi Bali dan Kepala Balai Inseminasi Buatan Daerah Baturiti beserta seluruh staf atas izin penelitian dan fasilitas yang diberikan selama penelitian dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariantje OS, Yusuf TL, Sajuti D, Arifiantini RI. 2013. Pengaruh Krioprotektan Gliserol dan Dimetilformamida dalam Pembekuan Semen Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Pengencer Tris Modifikasi. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 18: 239-250.
- Arifiantini RI. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. Bogor (ID): IPB Press.
- Arifiantini RI, Purwantara B. 2010. Motility and Viability of Frisian Holstein Spermatozoa in Three Different Extender Stored at 5°C. *Indones Trop Anim Agric* 35(4): 222-226.
- Arifiantini RI, Wresdiyati T, Retnani E F. 2006. Pengujian Morfologi Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Menggunakan Pewarnaan "Williams". *J Indones Trop Anim Agric* 31(2): 105-110.
- Arifiantini RI, Yusuf TL. 2010. Developing of Tris Soy Milk Diluent for Frisian Holstein bull frozen semen. *Hayati J of Biol* 17(2): 91-94
- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. 2002. Effect of Freezing Temperature. at Which Straw Were Plunged into Liquid Nitrogen. on The Post-Thaw Motility and Acrosomal Status of Ram Spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 72: 175-183.
- Baharun A, Arifiantini RI, Yusuf TL. 2017. Freezing capability of pasundan bull sperm using Tris egg yolk, Tris-soy, and Andromed® diluents. *J Ked Hewan*. 11(1): 45-49.
- Balic IM, Milinkovic-Tur S, Samardzija M, Vince S. 2012. Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls. *Theriogenology* 78(2): 423-431.
- Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim RR, Corcini CD, Bongalhardo DC, Correa EK, Lucia T Jr, Deschamps JC, Correa MN. 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology* 69(5): 632-638.
- Ball BA, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 22(6): 1061-1069.
- Baracaldo MI, Barth AD, Bertrand W. 2007. *Steps for Freezing Bovine Semen: from Semen Collection to the Liquid Nitrogen Tank*. *IVIS Reviews in Veterinary Medicine*. I.V.I.S. (Ed.). International Veterinary Information Service. Ithaca NY.
- Herdiawan I. 2004. Pengaruh Laju Penurunan Suhu dan Jenis Pengencer terhadap Kualitas Semen Beku Domba Priangan. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9(2): 98-107.

- Hoffman N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. 2011. Optimal Concentrations of Cryoprotective Agents for Semen from Stallions that are Classified 'Good' or 'Poor' for Freezing. *Anim Reprod Sci* 125: 112-118.
- Oh SA, Choi SH, Ko MH, Kang TY, Cho SR, Ko MS, Oh YM, Cho WM. 2012. Effect of amides as a cryoprotectant on quality of frozen-thawed sperm in Korean Jeju Black bull. *J Anim Sci Tech*: 54: 95-101.
- Jerez R, Gonzales N, Olaciregui M, Luno V, Blas I, Gil L. 2015. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. *Small Rum Res* 134: 34-38
- Katebi M, Movahedin M, Abdolvahabi AM, Akabar M, Abohassani F, Sobhani A, Aoki F. 2005. Changes in Motility Parameters of Mouse Spermatozoa in Response to Different Doses of Progesterone during Course of Hyperactivation. *Iranian Biomed J* 9(2): 73-79
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – a review. *Reprod Dom Anim* 46: 165-172.
- Komariah, Arifiantini RI, Nugraha FW. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesian holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan* 37(3): 143-147
- Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva AR. 2009. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 72: 650-654
- Marquez B, Suarez SS. 2007. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. *Biol Reprod* 76: 660-665.
- Minitube. Instructions Sperm Vision™. 2004. Art. No.12049/Minitube. Tiefenbach. Germany.
- Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alverenga, MA. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58: 273-276.
- Moustacas VS, Cruz BC, Varago FC, Miranda DA, Lage PG, Henry M. 2011. Extenders Containing Dimethylformamide Associated or Not with Glycerol are Ineffective for Ovine Sperm Cryopreservation. *Reprod Dom Anim* 46(5): 924-925.
- Naing SW, Wahid H, Azam KM, Rosnina Y, Zuki AB, Kazhala S, Bukara MM, Thein M, Kyaw T, San MM. 2010. Effect of Sugars on Characteristics of Boer Goat Semen After Cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 122(1-2): 23-28.
- Neto CR, Monteiro GA, Delfiol DJZ, Farras MC, Dell'aqua Jr JA, Papa FO, Alvarenga MA. 2013. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. *Liv Sci* 157(1): 358-363.
- Osorio JP, Mello FGC, Juliani GC, Lagares MA, Lago LA, Henry M. 2008. Effect on Post-Thaw Viability of Equine Sperm Using Stepwise Addition of Dimethylformamide and Varying Cooling and Freezing Procedures. *Anim Reprod Sci* 5(3/4): 103-109.
- Pukazhenthi BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, Silva MC, Alvarenga MA, Wildt DE. 2014. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology* 68(2): 205-214.
- Purwantara B, Noor RR, Andersson G, Rodriguez-Martinez H. 2012. Banteng and Bali Cattle in Indonesia: Status and Forecasts. *Reprod Dom Anim* 47(Suppl. 1): 2-6.
- Senger PL. 2005. *Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Concepton*. Washington. Washington State University Research and Technology Park.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan prosedur statistika*. Jakarta (ID). Gramedia Pustaka Utama.
- Undang-Undang No. 41 tahun 2014. Tentang Perubahan Atas Undang-Undang Nomor 18 Tahun 2009 Tentang Peternakan dan Kesehatan Hewan.
- Vilakazi DM, Webb EC. 2004. Effect of age and season on sperm morphology of Friesland bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *South Africa J Anim Sci* 34: 62-69.