

Maltosa Mempertahankan Viabilitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang yang Disimpan dalam Bentuk Cair

(*MALTOSE MAINTAIN THE VIABILITY OF SPOTTED BUFFALO EPIDIDYMAL SPERMATOZOA DURING LIQUID STORAGE*)

Yulnawati^{1*}, Hera Maheshwari², Muhammad Rizal³, Herdis⁴

^{1*} Pusat Penelitian Bioteknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI),
Jl. Raya Bogor km. 46, Cibinong, 16911, email: yulnawati@yahoo.com

² Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut
Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680

³ Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura,
Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon, 97233

⁴ Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung II BPPT Lt. 16,
Jl. M. H. Thamrin No. 8, Jakarta Pusat, 10340

ABSTRACT

A study to determine the effect of maltose supplement in andromed based semen extender on the viability of buffalo's epididymal spermatozoa following 12 and 24 hour storage as liquid semen. Epididymal spermatozoa were collected by combined methods of slicing, flushing and tissue pressure. The spermatozoa was then diluted with three different extenders, i.e Andromed only (A) as control, Andromed + 0.2% w/v Maltose (M1) and Andromed + 0.4% w/v Maltose (M2) as treatments. The percentages of progressively motil spermatozoa in the liquid semen in the following treatment of A, M1 and M2 were 48.33%; 53.33% and 55% respectively (after 12h of storage), and 45%; 46.67% dan 45% respectively (after 24h of storage). Besides, the percentage of live spermatozoa in A, M1 and M2 after 12h of storage were 70.33%; 72 % and 72.33 % and after 24h of storage were 66.33%; 70% and 70.67 %. In conclusion, the addition of 0.2% and 0.4% w/v maltose into Andromed extender could maintain the life of the spotted buffalo epididymal spermatozoa after storage for 4°C up to 24 hours.

Key words: maltose, viability, epididymal spermatozoa, spotted buffalo

PENDAHULUAN

Kerbau belang (*Tedong bonga*) merupakan salah satu fauna khas Indonesia yang dipercaya masyarakat hanya dapat hidup dan berkembang biak di daerah Tana Toraja, Sulawesi Selatan. Hewan ini memiliki fungsi sosial budaya yang sangat penting bagi masyarakat Toraja. Kerbau belang jantan selalu digunakan sebagai hewan persembahan pada setiap upacara adat, terutama pada saat upacara kematian. Sebagai akibatnya, populasi hewan ini terus menurun setiap tahunnya (Dinas Peternakan Kab. Tana Toraja, 2004). Salah satu upaya nyata yang dapat dilakukan untuk menghindari terjadinya kepunahan tanpa mengganggu adat masyarakat setempat adalah dengan menyelamatkan saluran reproduksi berupa jaringan epididimis yang merupakan tempat penyimpanan

spermatozoa pada saat pemotongan kerbau belang untuk upacara adat.

Jaringan epididimis terutama pada bagian kauda merupakan tempat penyimpanan spermatozoa sebelum ejakulasi. Spermatozoa epididimis diketahui memiliki daya fertilitas yang sama dengan spermatozoa asal ejakulat (Hafez dan Hafez, 2000). Hal tersebut juga didukung oleh beberapa penelitian sebelumnya yang menggunakan berbagai jenis spesies seperti rusa *eland* (Bisset dan Bernard, 2005), anjing (Setiadi *et al.*, 2007), kucing (Yulnawati dan Setiadi, 2005), sapi (Graham, 1994), dan kerbau afrika (Herrick *et al.*, 2004; Herold *et al.*, 2004; Herold *et al.*, 2006), diketahui memiliki kualitas setara dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Spermatozoa pada epididimis kerbau belang dapat dikoleksi dengan berbagai metode, seperti penyayatan / *slicing*, aspirasi dan pembilasan / *flushing*.

Spermatozoa yang diambil dari epididimis tersebut selanjutnya dapat disimpan dalam bentuk cair mau pun beku menggunakan bahan pengencer yang mengandung zat-zat penting yang dibutuhkan sel spermatozoa selama penyimpanan. Persyaratan utama yang harus dimiliki oleh suatu bahan pengencer semen adalah mengandung sumber energi, *buffer*, dan antibiotik untuk mencegah pertumbuhan kuman (Toelihere, 1993). Di samping itu, penambahan bahan pelindung berupa senyawa krioprotektan juga perlu dilakukan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa dengan cara mencegah kerusakan membran plasma sel selama penyimpanan pada suhu rendah. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992) senyawa krioprotektan terdiri atas dua golongan, yakni krioprotektan intraseluler dan ekstraseluler. Senyawa krioprotektan intraseluler seperti gliserol melindungi sel dengan cara masuk ke sitoplasma, sedangkan krioprotektan ekstraseluler seperti gula melindungi sel dari luar. *Andromed*[®] sebagai bahan pengencer dasar yang telah dikomersialkan, terdiri dari tris *hydroxy aminomethane* sebagai *buffer*, fruktosa sebagai sumber energi, asam sitrat, gliserol sebagai *cryoprotectant* dan beberapa jenis antibiotik (Minitub 2001).

Maltosa atau gula gandum termasuk golongan disakarida yang terdiri atas dua molekul glukosa. Maltosa diharapkan berfungsi ganda, yakni sebagai substrat sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler bagi sel selama penyimpanan. Pada penelitian ini akan diamati pengaruh penambahan maltosa ke dalam bahan pengencer dasar *Andromed* terhadap kualitas spermatozoa yang diambil dari epididimis kerbau belang setelah 12 dan 24 jam penyimpanan pada suhu rendah (4°C) dalam bentuk cair.

METODE PENELITIAN

Saluran kauda epididimis diperoleh saat pemotongan kerbau belang jantan pada upacara adat di Kecamatan Rante Pao, Kabupaten Tana Toraja. Saluran tersebut dibilas dan disimpan dalam larutan NaCl fisiologis (0,9%) sebagai media transportasi. Koleksi spermatozoa segera dilakukan dengan menggunakan kombinasi teknik *slicing*, pembilasan dan penekanan pada setiap jaringan kauda (Rizal *et al.*, 2004) menggunakan larutan *Andromed*[®] (Minitub,

Germany) sebagai bahan pengencer. Spermatozoa hasil koleksi disentrifugasi dengan kecepatan 500 G selama 20 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang dan sedimen yang mengandung spermatozoa diencerkan kembali dengan bahan pengencer yang disesuaikan dengan perlakuan yang akan dilakukan. Jumlah pengencer yang digunakan disesuaikan berdasarkan hasil perhitungan konsentrasi yang telah dilakukan sebelumnya. Spermatozoa segar hasil koleksi dievaluasi kualitasnya meliputi persentase motilitas dan persentase spermatozoa hidup.

Spermatozoa yang diperoleh dibagi ke dalam tiga bahan pengencer yang telah disiapkan, yaitu *Andromed*[®] (A) sebagai kontrol, *Andromed*[®]+Maltosa 0,2% w/v (M1) dan *Andromed*[®]+Maltosa 0,4% w/v (M2) sebagai perlakuan. Pengamatan dilakukan setelah 12 dan 24 jam penyimpanan dalam bentuk cair pada suhu ±4°C. Peubah yang diamati terhadap kualitas spermatozoa yang diambil dari epididimis adalah: persentase motilitas dan persentase spermatozoa hidup.

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan setiap perlakuan terdiri dari lima ulangan. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (Anova). Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

Persentase motilitas progresif (bergerak ke depan) spermatozoa dihitung secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya, pembesaran lensa objektif 40x (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%. Untuk menghitung persentase hidup, digunakan pewarnaan eosin B. Spermatozoa hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah (Toelihere, 1993). Sedikitnya 200 spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x untuk masing-masing peubah yang dievaluasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan diperoleh hasil bahwa setelah penyimpanan 12 dan 24 jam pada suhu 4°C, secara umum kualitas spermatozoa yang diambil dari epididimis kerbau belang cenderung mengalami penurunan (Tabel 1). Hal tersebut sesuai dengan

penelitian sebelumnya pada berbagai spesies hewan, bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa mengalami penurunan secara bertahap selama disimpan pada suhu 4°C (Bissett dan Bernard, 2005).

Standar minimal persentase motilitas spermatozoa yang masih layak untuk digunakan pada kegiatan inseminasi buatan (IB) adalah sebesar 40% pada berbagai spesies ternak (Hafez dan Hafez, 2000). Persentase motilitas spermatozoa yang diambil dari epididimis dalam ketiga bahan pengencer pada 0 jam penyimpanan dalam penelitian ini adalah sebesar 65,00% (P>0,05). Namun, kemudian mengalami penurunan setelah disimpan selama 12 jam (A: 48,33%, M1: 53,33% dan M2: 55%). Secara statistika, tidak ada perbedaan nyata (P>0,05) persentase motilitas spermatozoa yang diambil dari epididimis kerbau belang setelah penyimpanan 12 dan 24 jam, dalam ketiga jenis bahan pengencer. Setelah 24 jam penyimpanan, persentase motilitas dalam bahan pengencer A, M1 dan M2 secara berturut-turut adalah 45,00; 46,67 dan 45,00%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa setelah 24 jam penyimpanan pada suhu 4°C spermatozoa kerbau belang yang digunakan pada penelitian ini masih layak digunakan untuk IB.

Penelitian pada semen cair asal ejakulat domba garut yang menggunakan bahan pengencer dasar Tris kuning telur ditambah maltosa 0,6 dan 1,2 % w/v menunjukkan persentase motilitas setelah disimpan 24 jam adalah sebesar 65,0 dan 67,5 % (Herdis, 2005). Perbedaan ini diduga akibat perbedaan jenis semen dan spesies ternak serta bahan pengencer yang digunakan.

Persentase hidup spermatozoa yang diambil dari epididimis kerbau belang secara nyata lebih baik (P<0,05) dalam bahan pengencer perlakuan (M1 dan M2) daripada kontrol (A) setelah 24 jam

penyimpanan pada suhu rendah. Diduga keberadaan maltosa sebagai tambahan substrat sumber energi dalam bahan pengencer dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan dalam bentuk cair. Di samping sebagai sumber energi, maltosa juga berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler. Krioprotektan ekstraseluler diperlukan untuk melindungi membran plasma spermatozoa terhadap terjadinya kejutan dingin (*cold shock*) selama penyimpanan pada suhu rendah (4°C). Membran plasma sel yang baik akan memungkinkan proses metabolisme berjalan lancar, sehingga berpengaruh positif terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Gula dapat menjadikan membran plasma sel spermatozoa lebih stabil selama proses penyimpanan beku (Strauses *et al.*, 1986; Anchordoguy *et al.*, 1987; Bakas dan Disalvo, 1991). Gula juga memegang peranan penting dalam menurunkan kandungan garam larutan pengencer, sehingga dapat mengurangi *solution effect* (Supriatna dan Pasaribu, 1992). Hal tersebut menyebabkan gula dapat mencegah perusakan sel akibat meningkatnya kadar garam (Nicollajsen dan Hvidt, 1994).

Penyimpanan pada suhu rendah (4°C) menyebabkan penurunan metabolisme dan mendekati apoptosis sel. Hal tersebut menyebabkan persentase motilitas dan hidup spermatozoa menurun seiring dengan lamanya masa penyimpanan. Oleh karena itu, ketersediaan substrat sumber energi yang cukup dalam bahan pengencer yang digunakan, memegang peranan penting untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu rendah.

Maltosa (C₁₂H₂₂O₁₁) merupakan gula disakarida yang terdiri atas dua unit glukosa (ikatan 1-4a). Unit glukosa tersebut akan dime-tabolisme oleh sel melalui jalur glikolisis dan

Tabel 1. Rataan persentase motilitas dan hidup spermatozoa yang diambil dari epididimis kerbau belang pada penyimpanan (4°C) dalam bentuk cair

Perlakuan	0 jam (segar)		12 jam		24 jam	
	% M	% H-M	% M	% H-M	% M	% H-M
Andromed (A)	65,00±0,00 ^a	76,00±2,83 ^a	48,33±2,36 ^a	70,33±0,47 ^a	45,00±4,08 ^a	66,33±1,25 ^a
Maltosa 0,2 % (M1)	65,00±0,00 ^a	76,67±3,86 ^a	53,33±2,36 ^a	72,00±1,63 ^a	46,67±2,36 ^a	70,00±0,82 ^b
Maltosa 0,4 % (M2)	65,00±0,00 ^a	79,33±2,49 ^a	55,00±4,08 ^a	72,33±0,94 ^a	45,00±4,08 ^a	70,67±1,25 ^b

Ket. ^{a,b} Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05). M: Motilitas, H-M: jumlah spermatozoa yang hidup

siklus Krebs untuk menghasilkan energi berupa *adenosine tri phosphate* (ATP). ATP sangat diperlukan oleh sel untuk pergerakan (motilitas) spermatozoa. Energi yang diperoleh dari hasil metabolisme fruktosa serta maltosa digunakan oleh sel untuk sintesis protein dalam rangka mempertahankan organel sel agar tetap aktif menjalankan fungsi sel. Menurut Subowo (1995) di dalam membran plasma sel terdapat banyak makromolekul seperti protein, lipoprotein, glikoprotein, dan lain-lain yang dapat berfungsi sebagai enzim, reseptor, saluran, atau pembawa (*carrier*). Makromolekul-makromolekul tersebut memfasilitasi lalu lintas masuk dan keluar sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Dalam kelompok perlakuan pada penelitian ini, penambahan maltosa ke dalam pengencer Andromed yang juga telah mengandung gula fruktosa terbukti dapat mempertahankan tingkat metabolisme sel lebih baik daripada bahan pengencer Andromed yang tidak mendapat penambahan maltosa (kontrol).

SIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa penambahan maltosa 0,2 dan 0,4% ke dalam bahan pengencer Andromed dapat mempertahankan motilitas dan jumlah spermatozoa hidup yang diambil dari epididimis kerbau belang setelah 24 jam penyimpanan 4°C. Di samping itu, setelah 24 jam penyimpanan dalam bentuk semen cair, spermatozoa yang diambil dari epididimis kerbau belang masih layak digunakan untuk kegiatan IB,.

SARAN

Disarankan untuk melakukan penelitian lanjutan dengan menggunakan hasil penelitian ini dalam kegiatan IB pada kerbau

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini didanai oleh DIPA BIOTROP 2008 dengan nomor kontrak No. 047.1/PSRP-SP/III/2008. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sub Dinas Peternakan Kabupaten Tana Toraja, Keluarga dr. Yulius dan Bapak Slamet Sumitro yang telah membantu dalam

penyediaan peralatan laboratorium, pengadaan dan pengambilan sampel epididimis kerbau belang.

DAFTAR PUSTAKA

- Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH.. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
- Bakas LS, Disalvo EA. 1991. Effects of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 28:347-353.
- Bissett C, Bernard RTF. 2005. The effect of prolonged cold storage of eland (*Taurotragus oryx*) kauda epididymides on the spermatozoa: possible implications for the conservation of biodiversity. *Theriogenology* 63: 1592-1604.
- Dinas Peternakan Kabupaten Tana Toraja. 2004. Laporan Tahunan.
- Graham JK. 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 ESE, Hafez B. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th Edition. Baltimore: Lippicott Williams & Wilkins.
- Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). *Disertasi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Herold FC, Aurich JE, Gerber D. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncerus caffer*) can be frozen successfully with Andromed^a and Triladyl^a but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61: 715-724.
- Herold FC, de Haas K, Colenbrander B, Gerber D. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl^a or Andromed^a. *Theriogenology* 66: 1123-1130.
- Herrick JR, Bartels P, Krisher RL. 2004. Postthaw evaluation of in vitro function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovids. *Biol. Reprod.* 71: 948-958.
- Minitub. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfull und Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.

- Nicollajsen H, Hvidt A. 1994. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. *Cryobiology* 31:199-205.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22:278-283.
- Rizal M, Herdis, Boediono A. 2004. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). *J Anim Prod* 6(1): 30-36.
- Setiadi MA, Yulnawati, Suprayogi A. 2007. Kualitas spermatozoa epididimis anjing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *JITV*. 12 (2): 134-138.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Straussess G, Schurtenberger P, Huser H. 1986. The interaction of saccharides with lipid bilayer: Stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochem Biophys Acta* 858:169-180.
- Subowo. 1995. *Biologi Sel*. Bandung: Angkasa.
- Supritana I, Pasaribu FH. 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *J Med Vet* 21(3): 100-104.