

Identifikasi Bakteri dan Efektivitas Antibiotik dalam Pengencer untuk Mengontrol Pertumbuhan Bakteri pada Semen Sapi *Friesian Holstein*

(*BACTERIAL IDENTIFICATION AND EFFICACY OF ANTIBIOTICS IN EXTENDER
FOR CONTROLLING THE GROWTH OF BACTERIA IN FRIESIAN HOSLSTEIN SEMEN*)

Muttaqinullah Rabusin¹, Andriani²,
Raden Iis Arifiantini³, Ni Wayan Kurniani Karja³

¹Program Studi Biologi Reproduksi,

²Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor,

³Bagian Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,

Jln. Agatis, Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680,

E-mail: karjanwk13@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri di dalam semen segar sapi *Friesian Holstein* (FH) dan menguji efektivitas kombinasi antibiotik penisilin dan streptomisin (PS) atau gentamisin, tilosin, linkomisin, dan spektinomisin (GTLS) di dalam pengencer semen terhadap perkembangan bakteri. Penelitian ini dilakukan dalam tiga tahap. Tahap 1, dilakukan identifikasi bakteri dalam semen segar segera setelah koleksi. Tahap 2, dilakukan identifikasi bakteri pada pengencer yang digunakan untuk pembekuan semen. Tahap 3, dilakukan identifikasi bakteri dalam semen beku. Dalam penelitian ini berhasil ditemukan tiga jenis bakteri dalam semen segar, yaitu *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., dan *Pediococcus* sp. Tiga jenis bakteri ditemukan di dalam pengencer semen, yaitu *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas diminuta* dan *Serratia plymutica* dan dua jenis bakteri ditemukan di dalam semen beku, yaitu *Enterobacter cloacae* dan *Serratia plymutica*. Dari data tersebut dapat disimpulkan ditemukan bakteri yang umum terdapat pada lingkungan dan antibiotik PS dan GTLS mempunyai efektivitas yang sama dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan tidak memengaruhi kualitas semen

Kata-kata kunci: bakteri; antibiotik pengencer; semen sapi

ABSTRACT

This study was designed to investigate the presence of bacterial species in *Friesian Holstein* (FH) bovine semen at the time of collection, processing and to assess the efficacy of two types of antibiotics combinations; penicillin and streptomycin (PS) and gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin (GTLS) in semen extender on bacterial control and quality of semen. For this purpose, three experiments were conducted. In experiment 1, identification of bacterial content in fresh semen which collected from 5 bovine ejaculates. In experiment 2, identification of bacterial content in skim milk-egg yolk extender which were prepared in artificial insemination center, Lembang, Bandung. In experiment 3, identification of bacterial content in frozen thawed semen. In the result, some of bacterial species were isolated from the bovine semen. The GTLS combination of antibiotics may be incorporated into a freezing extender or protocol without compromising the post-thawed semen quality of FH bull spermatozoa. Three types of bacteria were found in fresh semen; *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., and *Pediococcus* sp.. Three types of bacteria were found in semen extender; *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas diminuta* and *Serratia plymutica*. Two types of bacteria were found in frozen semen; *Enterobacter cloacae* and *Serratia plymutica*. In conclusion, antibiotics PS and GTLS were effective for controlling the growth of bacteria in frozen semen.

Keywords: bacterial species; bovine semen; extender; antibiotic

PENDAHULUAN

Semen terdiri atas spermatozoa dan plasma semen yang diejakulasikan hewan jantan dan dapat digunakan untuk proses pembuahan. Semen yang dimaksud adalah semen dari hewan jantan unggul sebagaimana disebutkan dalam Standar Nasional Indonesia (SNI) 2017 Tentang Semen Beku Sapi (BSN 2017). Semen merupakan media yang mengandung nutrisi dan protein sehingga ideal bagi pertumbuhan mikroorganisme (Martin *et al.*, 2010). Beberapa bakteri patogen serta bakteri *saprophytic* juga dapat mengontaminasi semen sapi (Gloria *et al.*, 2014). Bakteri yang terdapat dalam semen dapat bersumber dari testis, kelenjar aksessoris, vas deferens, urethra, preputium atau penis (Thibier dan Guerin, 2000).

Mikroorganisme memberikan efek buruk secara langsung pada fungsi reproduksi, di antaranya menyebabkan agglutinasi spermatozoa, mengurangi kemampuan reaksi akrosom, merusak morfologi spermatozoa dan *deoxyribonucleid acid* (DNA) *integrity* spermatozoa (Moretti *et al.*, 2009; González-Marín *et al.*, 2011). Kontaminasi mikroorganisme juga dapat terjadi selama pengolahan semen menjadi semen beku. Semen beku yang digunakan untuk IB apabila terkontaminasi oleh mikroorganisme dalam jumlah di atas 5 000 *colony form unit* (cfu) per mililiter dapat menyebabkan penurunan angka kebuntingan dan penyebaran penyakit pada sapi betina (Thibier dan Guerin, 2000). Beberapa bakteri yang umum ditemukan pada semen sapi yaitu *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* dan *Citrobacter* (Shin *et al.*, 1988; Abro *et al.*, 2016).

Bakteri yang terkandung dalam semen dapat dikontrol dan dihambat pertumbuhannya dengan pemberian antibiotik (Gloria *et al.*, 2014). Antibiotik yang digunakan dalam produksi semen beku di Balai Inseminasi Buatan (BIB) di seluruh Indonesia hingga saat ini adalah kombinasi antibiotik penisilin dan streptomisin (PS). Banyak antibiotik yang telah diteliti baik dosis, metode pemberian, dan interaksinya dengan pengencer. Kombinasi antibiotik yang lebih efisien telah dikembangkan oleh Shin *et al.* (1988) yaitu gentamisin, tilosin, linkomisin, dan spektinomisin (GTLS) yang telah digunakan secara luas di Amerika dan Eropa (Morrell dan Wallgren, 2014). Pengencer semen beku komersial yang beredar luas di berbagai negara telah menggunakan jenis antibiotik GTLS.

Balai IB nasional yang ada di Indonesia sejak tahun 2013 telah mengeksplor semen beku ke Malaysia, Myanmar, Kamboja, Afganistan, Kirgystan, dan Kazakhstan (DJKH 2015). Mengacu pada ketentuan dunia internasional, perlu dilakukan kajian terhadap penggunaan jenis antibiotik yang dapat diterima oleh dunia internasional sehingga produk semen beku Indonesia dapat bersaing dan berkembang secara global. Penelitian mengenai isolasi dan identifikasi bakteri pada produksi semen sapi di Indonesia masih jarang dilakukan, sehingga sulit mendapatkan informasi atau data mengenai jenis bakteri dalam semen. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan bakteri dalam semen sapi dan kombinasi serta antibiotik alternatif yang tepat untuk mengontrol bakteri, sehingga menghasilkan semen beku sapi yang berkualitas, aman dan bebas dari penyakit.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap. Tahap 1, dilakukan identifikasi bakteri dalam semen segar segera setelah koleksi. Tahap 2, dilakukan identifikasi bakteri pada pengencer yang digunakan untuk pembekuan semen. Tahap 3, dilakukan identifikasi bakteri dalam semen beku. Koleksi semen dilakukan pada lima ekor pejantan sapi FH di BIB Lembang, Bandung, Jawa Barat. Semen dikoleksi dengan vagina buatan yang telah disterilkan dan sapi pejantan digunakan sebagai *teaser* (pengusik). Prosedur koleksi semen dilakukan sesuai *standard operating procedure* (SOP) BIB Lembang. Sampel semen yang dikoleksi, dari vagina buatan dimasukkan ke dalam tabung steril, disimpan di dalam *cold box* suhu 4°C kemudian dibawa ke laboratorium bakteriologi Balai Besar Penelitian Veteriner (Bbalitvet) Bogor untuk dilakukan isolasi, identifikasi dan penghitungan jumlah koloni bakteri.

Isolasi, identifikasi dan penghitungan jumlah koloni bakteri dilakukan dengan mengacu pada SNI 2897: 2008. Sebanyak 200 µL sampel semen dimasukkan ke dalam media cair *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diinokulasikan pada permukaan media selektif *Mac Conkey Agar* (MCA) dan *Eosin Methylene Blue* (EMB) agar untuk isolasi dan identifikasi bakteri Gram negatif, sedangkan media *Blood Agar* (BA) untuk bakteri gram positif. Media selektif agar yang telah diinokulasi

selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam dengan posisi cawan Petri terbalik. Isolasi dan identifikasi *Campylobacter* sp. dilakukan dengan memasukkan 200 µL sampel semen ke dalam media cair *Nutrient Broth* No. 2 (NB No. 2, Oxoid) yang telah ditambahkan *growth supplement* (Oxoid SR 232E), kemudian diinkubasikan pada suhu 42°C dalam kondisi mikroaerofilik (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Inkubasi dilakukan menggunakan *jar* yang telah diisi *CampyGen* (Oxoid). Selanjutnya kultur diinokulasikan pada media CCDA yang mengandung *CCDA selective supplement* (Oxoid SR 155E) dan diinokulasikan kembali pada suhu 42°C pada kondisi mikroaerofilik seperti tersebut selama 24-48 jam. Identifikasi bakteri dari media agar selektif (MCA, BA, EMB dan CCDA) dilakukan dengan uji motilitas, pewarnaan Gram, uji katalase dan oksidase, uji terhadap gula-gula.

Penghitungan jumlah bakteri dilakukan dengan cara sebanyak 200 µL sampel semen dimasukkan ke dalam *buffer saline* dan dilakukan pengenceran secara bertingkat. Selanjutnya sebanyak 100 µL dimasukkan ke dalam cawan Petri steril kemudian ditambahkan media *plate count agar* (PCA) sebanyak 15 mL yang telah dihangatkan pada suhu 44±2°C kemudian dihomogenkan dan disimpan pada suhu ruang hingga agar memadat. Setelah agar memadat, cawan Petri yang telah berisi inoculum diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung.

Tahap kedua dari penelitian ini adalah isolasi dan identifikasi bakteri dalam pengencer sebelum digunakan. Pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengencer skim kuning telur yang rutin digunakan di Balai IB Lembang, yaitu pengencer. Pengencer semen tersebut kemudian dibagi dalam tiga kelompok (Tabel 1) yaitu; kelompok P-AB (-) pengencer tanpa antibiotik, P-AB (PS) dengan kombinasi antibiotik penisilin dan streptomisin, dan kelompok P-AB (GTLS) dengan kombinasi antibiotik gentamisin, tilosin, linkomisin dan spektinomisin menggunakan metode BIB Lembang dan Shin *et al.* (1988). Sebanyak lima mililiter dari masing-masing pengencer kemudian disimpan di dalam *cold box* (suhu 4 °C) dan dibawa ke laboratorium bakteriologi BBLITVET Bogor untuk diproses lebih lanjut. Isolasi, identifikasi, dan penghitungan jumlah koloni bakteri pada pengencer dilakukan sama dengan tahap pertama.

Tahap ketiga dilakukan untuk identifikasi bakteri dalam semen beku dan untuk melihat efektivitas antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri dalam semen. Koleksi semen dilakukan seperti pada tahap satu dari penelitian. Semen yang dikoleksi segera diamati sesuai SOP di BIB Lembang. Pengamatan dilakukan secara makroskopik dan mikroskopik. Pengamatan makroskopik meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH. Pengamatan mikroskopik yaitu gerakan massa, persentase spermatozoa motil (%), dan konsentrasi spermatozoa (juta mL⁻¹). Semen selanjutnya dibagi tiga, masing-masing diencer dengan pengencer skim kuning telur sesuai dengan tahap kedua. Semen yang sudah dicampurkan ke dalam bahan pengencer, dikemas dalam *straw* 0,25 mL (Minitube Jerman) menggunakan mesin otomatis (*Combo System* Minitube Jerman) dengan konsentrasi 25 × 10⁶ spermatozoa per *straw*. Semen dalam *straw* diekuilibrasikan pada suhu 4 °C selama 4 jam. Pembekuan semen dilakukan menggunakan mesin otomatis (Digit Cool 5300 ZB 250 IMV Prancis) selama 9 menit. Mesin diprogram dengan laju penurunan 3 °C per menit dari suhu +4 °C ke -10 °C, 40 °C per menit dari suhu -10 °C ke -100 °C dan 20 °C per menit dari suhu -100 °C ke -140 °C. Semen yang telah dibekukan dimasukkan ke dalam N₂ cair suhu -196 °C dalam kontainer N₂ cair.

Sampel semen beku dibawa ke laboratorium bakteriologi BBLITVET Bogor untuk dilakukan isolasi dan identifikasi bakteri. *Straw* di-*thawing* pada suhu 37°C, selama 30 detik. Isolasi, identifikasi, dan penghitungan jumlah koloni bakteri pada semen beku dilakukan sama dengan tahap pertama. Data jenis dan jumlah bakteri yang diperoleh disajikan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan sampel yang dilakukan, tidak ditemukan bakteri *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, dan *Campylobacter* pada semen segar. Bakteri *Klebsiella* sp. ditemukan tumbuh pada MCA. Bakteri *Micrococcus* sp. dan *Pediococcus* sp. ditemukan pada media BA. Jumlah koloni bakteri atau *total plate count* (TPC) pada kelima semen segar, paling tinggi ditemukan pada semen segar dari sapi no. 1 sebanyak 1,04 × 10² *colony form unit* (cfu)/mL. Bakteri *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., dan *Pediococcus* sp., ditemukan pada sapi no. 1 tersebut. Sebanyak 8.00 × 10¹ cfu/mL koloni

bakteri ditemukan pada sapi no. 2. Dua ekor sapi yaitu no. 3 dan 5 memiliki jumlah bakteri yang sama yaitu 1.00×10^1 cfu/mL, namun memiliki jenis bakteri yang berbeda, masing-masing sampel ditemukan bakteri *Micrococcus* sp., dan *Pediococcus* sp.. Semen segar dari sapi no. 4 tidak ditemukan koloni bakteri yang tumbuh.

Informasi mengenai bakteri dalam semen hewan ternak di Indonesia masih terbatas. Publikasi mengenai keberadaan bakteri di dalam semen pernah dilaporkan tahun 1985 oleh Poeloengan (1985). Sebanyak 11 bakteri dilaporkan dalam publikasi tersebut yaitu *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Alkaligenes*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Crhomobacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, dan *Proteus*. Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 10/Permentan/PK.210/3/2016 (Kementan 2016), tentang Penyediaan dan Peredaran Semen Beku Ternak Ruminansia disebutkan bahwa semen beku ternak ruminansia yang diedarkan harus memenuhi persyaratan kesehatan hewan pejantan unggul dan bebas penyakit *anthraks*, *brucellosis* (*Brucella abortus*), *Bovine Viral Diarrhea* (BVD), *Septicaemia epizootical (haemorrhagic septicaemia)*, *Infectious Bovine Rhinotracheitis*, *Enzootic Bovine Leucosis* (EBL), *Bovine Tuberculosis*, *Paratuberculosis*, *Leptospirosis*, *Camphylobacteriosis*, *Trichomoniasis*, dan penyakit jembrana untuk sapi bali.

Dalam penelitian ini tidak ditemukan bakteri patogen di dalam semen segar. Hal ini karena manajemen kesehatan hewan dan produksi semen di Balai IB sudah baik, sehingga kondisi kesehatan sapi pejantan tetap terkontrol. Bakteri yang ditemukan dalam semen segar adalah bakteri yang umum ditemukan pada lingkungan yang mungkin mencemari peralatan, dan atau proses penampungan sampai pembekuan semen.

Bakteri Gram negatif dicirikan dengan koloni mukoid, berbentuk batang, tidak motil, begitu pula dalam *Voges Proskauer* (VP) test hasilnya negatif, katalase positif, oksidase negatif diidentifikasi sebagai bakteri *Klebsiella* sp. Bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, *non motile*, *non sporing*, aerobik, katalase positif, oksidase positif diidentifikasi sebagai bakteri *Micrococcus* sp., sedangkan yang berbentuk kokus yang berpasangan dua atau empat, katalase positif,

oksidase negatif diidentifikasi sebagai bakteri *Pediococcus* sp. (Cowan *et al.*, 1993).

Bakteri *Klebsiella* sp. merupakan bakteri yang umum ditemukan di lingkungan, air, tanah, dan tanaman. Bakteri *Klebsiella* sp. pada hewan, dapat menyerang tubuh ketika kondisi pertahanan tubuh menurun. Bakteri *Klebsiella* sp. pada semen merupakan *bacteriospermia* yang dapat memengaruhi kualitas semen (Ibadin dan Ibeh 2008). Bakteri *Micrococcus* sp. merupakan bakteri yang mirip dengan *staphylococci* dan mudah ditemukan pada lingkungan dan jarang berhubungan dengan penyakit. Brown *et al.* (1974) juga melaporkan di dalam penelitiannya telah ditemukan bakteri *Micrococcus* sp. di dalam semen segar sapi. Andrabi *et al.* (2016) melaporkan terdapat bakteri *Micrococcus* sp. di dalam semen segar kerbau. *Pediococcus* sp. pada ternak merupakan *microbial flora* normal dan dapat ditemukan di dalam feses (Fuquay *et al.* 2011).

Jumlah koloni bakteri yang didapatkan dalam penelitian ini jumlah yang paling tinggi sebesar $1,04 \times 10^2$ cfu/mL. Poeloengan (1985) melaporkan jumlah koloni bakteri semen segar sapi sebesar $1,00 \times 10^2$ sampai dengan $3,60 \times 10^5$. Brown *et al.* (1974) melaporkan hasil penelitiannya bahwa jumlah koloni bakteri semen segar sapi FH adalah $2,00 \times 10^2$ sampai dengan $5,34 \times 10^5$. Sannat *et al.* (2015) melaporkan bahwa jumlah koloni bakteri pada semen segar sapi yaitu sebesar $2,36 \times 10^4$ cfu/mL. Sementara itu Patel *et al.* (2011) melaporkan ditemukannya koloni bakteri pada semen sapi *Guernsey*, FH, dan *Jersey* masing-masing $2,6 \times 10^5$; $1,3 \times 10^5$, dan $5,3 \times 10^4$ cfu/mL. Berbedanya jumlah koloni bakteri, kemungkinan dapat dipengaruhi oleh lingkungan, kebersihan petugas dan alat koleksi semen yang digunakan serta dapat dipengaruhi oleh *breed* (Patel *et al.*, 2011). Perumal *et al.* (2013) menyatakan bahwa lubang preputium dapat menjadi sumber utama dari berbagai jenis bakteri yang berasal dari tanah, *bedding*, dan feses.

Pengencer semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah skim kuning telur. Pengencer dibagi tiga kelompok yaitu pengencer tanpa antibiotik (P-AB (-)), pengencer dengan menggunakan antibiotik penisilin dan streptomisin (P-AB (PS)), dan pengencer dengan menggunakan antibiotik gentamisin, tilosin, linkomisin, dan spektinomisin P-AB (GTLS). Ketiga kelompok pengencer semen ditanam pada berbagai media agar untuk menumbuhkan

Tabel 1. Jenis dan dosis antibiotik dalam media pengencer

Kelompok	Antibiotik	Dosis
P-AB (-) P-AB (PS)*	Tanpa antibiotik	Penisilin (IU mL ⁻¹) -1000
P-AB (GTLS)**	Streptomisin (mg mL ⁻¹)	1
	Gentamisin (µg mL ⁻¹)	500
	Tilosin (µg mL ⁻¹)	100
	Linkomisin (µg mL ⁻¹)	300
	Spektinomisin (µg mL ⁻¹)	600

Keterangan: kelompok P-AB (-) pengencer tanpa antibiotik, P-AB (PS) dengan kombinasi antibiotik penisilin dan streptomisin, dan kelompok P-AB (GTLS) dengan kombinasi antibiotik gentamisin, tilosin, linkomisin dan spektinomisin. *BIB Lembang, ** Shin *et al.* (1988)

Tabel 2. Jenis bakteri dan jumlah koloni bakteri di dalam pengencer

No	Pengencer	Jumlah bakteri (cfu/mL)	Jenis bakteri
1	P-AB (-)	$5,12 \times 10^3$	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas diminuta</i> dan <i>Serratia plymutica</i>
2	P-AB (PS)	$1,22 \times 10^3$	<i>Serratia plymutica</i>
3	P-AB (GTLS)	$8,30 \times 10^2$	<i>Enterobacter cloacae</i>

Keterangan: P-AB (-) = Pengencer tanpa antibiotik, P-AB (PS) = Pengencer dengan antibiotik penisilin dan streptomisin, P-AB (GTLS) = Pengencer dengan antibiotik gentamisin, tilosin, linkomisin, dan spektinomisin

Tabel 3. Jenis bakteri dan jumlah koloni bakteri di dalam semen beku

No	Semen beku	Jumlah bakteri (cfu/mL)	Jenis bakteri (n sapi)
1	P-AB (-)	7.76×10^3	<i>Enterobacter cloacae</i> (4) <i>Serratia plymutica</i> (1)
2	P-AB (PS)	7.10×10^2	<i>Enterobacter cloacae</i> (5)
3	P-AB (GTLS)	4.90×10^2	<i>Enterobacter cloacae</i> (5)

Keterangan: P-AB (-) = Pengencer tanpa antibiotik, P-AB (PS) = Pengencer dengan antibiotik penisilin dan streptomisin, P-AB (GTLS) = Pengencer dengan antibiotik gentamisin, tilosin, linkomisin, dan spektinomisin

bakteri *E. coli*, *Pseudomonas*, *Stapylococcus*, *Streptococcus*, dan *Camphylobacter*. Bakteri yang ditemukan adalah *Pseudomonas*, namun empat bakteri lainnya tidak ditemukan. Ditemukan bakteri jenis lain yaitu bakteri *Enterobacter cloacae* dan *Serratia plymutica*. Pengencer P-AB (-) ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas diminuta* dan *Serratia plymutica*. Pengencer P-AB (PS) hanya ditemukan bakteri *Serratia plymutica* dan pada pengencer P-AB (GTLS) ditemukan bakteri *Enterobacter cloacae*. Pengamatan terhadap media PCA

diketahui jumlah koloni bakteri dalam pengencer. Jumlah koloni bakteri pada pengencer P-AB (-) yaitu sebanyak $5,12 \times 10^3$ cfu/mL. Jumlah koloni pada pengencer P-AB (PS) ditemukan koloni sebanyak $1,22 \times 10^3$ cfu/mL, dan pengencer P-AB (GTLS) ditemukan koloni sebanyak $8,30 \times 10^2$ cfu/mL. Pertumbuhan jenis bakteri dan jumlah koloni bakteri di dalam pengencer disajikan pada Tabel 2.

Keberadaan bakteri pada pengencer semen di Indonesia masih sulit ditemukan. Laporan Hoyos-Marulanda *et al.* (2017) pada pengencer semen sapi ditemukan berbagai jenis bakteri

seperti *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus capitis*, *Rhizobium radiobacter*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*, *Sphigomonas paucimobilis*, *Aeromonas salmonicidae*, *Aerococcus viridans*.

Qadeer *et al.* (2013) meneliti bakteri dalam pengencer Tris asam sitrat ditemukan jumlah koloni bakteri sebanyak $3,00 \times 10^3$ sampai dengan $15,00 \times 10^3$ cfu/mL tanpa menyebutkan jenis bakteri yang ditemukan di dalam pengencer tersebut. Meena *et al.* (2015) melaporkan dalam pengencer Tris kuning telur memiliki jumlah koloni bakteri dengan nilai rata-rata yaitu $3,80 \times 10^2$ cfu/mL juga tidak menyebutkan jenis bakteri yang ditemukan. Penelitian Akhter *et al.* (2013) menggunakan PS dalam pengencer Tris asam sitrat ditemukan jumlah koloni bakteri $7,00 \times 10^2$. Keberadaan bakteri di dalam pengencer semen bisa terjadi akibat kontaminasi saat proses pembuatan pengencer, karena dalam pengencer memiliki nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme (Morrel 2014).

Bakteri *enterobacter* adalah bakteri Gram negatif, bentuk batang, motil, aerobik dan anaerobik fakultatif, katalase positif, oksidase negatif, memecah fermentasi gula, memproduksi gas, VP positif, *gluconate* positif, gelatin mencair dengan perlahan, dan memproduksi ornithine *decarboxylase* (Cowan *et al.*, 1993). Kemudian bakteri *Pseudomonas* merupakan Gram negatif, bentuk batang, motil (dengan *flagella polar*), aerobik, katalase positif, oksidase positif, memecah gula dengan oksidasi, *fluorescent*, dapat mendifusi pigment kuning pada beberapa spesies. Bakteri *Serratia* adalah bakteri Gram negatif, bentuk batang, motil, aerobik dan anaerobik fakultatif, katalase positif, oksidase negatif, memecah fermentasi gula, sering menghasilkan gas pada beberapa spesies, umumnya VP positif, *gluconate* positif, beberapa spesies menghasilkan ornithin *decarboxylase*, *deoxyribonuclease* positif, beberapa spesies menghasilkan pigment merah saat tumbuh di media (Cowan *et al.*, 1993). Ketiga bakteri yang ditemukan merupakan tidak tergolong bakteri patogen dan banyak terdapat di lingkungan, kemungkinan bakteri yang ada di dalam pengencer bersumber dari lingkungan dan alat yang digunakan pada saat pembuatan bahan pengencer.

Semen beku yang telah di-*thawing* dilakukan uji identifikasi bakteri. Semen beku ditanam di berbagai media agar seperti pada tahap pertama. Hasil evaluasi bakteri pada semen beku, tidak ditemukan bakteri *E. coli*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, dan *Camphylobacter*, akan tetapi ditemukan bakteri jenis lain yaitu bakteri *Enterobacter cloacae* dan *Serratia plymutica*. Semen beku dalam pengencer P-AB (-) memiliki jumlah koloni bakteri $7,76 \times 10^3$ cfu/mL dan ditemukan bakteri *Enterobacter cloacae* (ditemukan pada empat ekor sapi) dan bakteri *Serratia plymutica* (ditemukan pada satu ekor sapi). Semen beku dari pengencer P-AB (PS) memiliki jumlah koloni bakteri $7,10 \times 10^2$ cfu/mL dan ditemukan bakteri *Enterobacter cloacae* (ditemukan pada lima ekor sapi). Selanjutnya kelompok semen beku dari pengencer P-AB (GTLS) memiliki jumlah koloni bakteri sebanyak $4,90 \times 10^2$ cfu/mL dan ditemukan bakteri *Enterobacter cloacae* (ditemukan pada lima ekor sapi). Hasil pertumbuhan jenis bakteri dan jumlah koloni bakteri di dalam pengencer disajikan pada Tabel 3.

Najee *et al.*, (2012) melaporkan telah ditemukan bakteri *Stenotrophomonas maltophilia* dan *Pseudomonas aeruginosa* di dalam semen beku sapi. Berbedanya jenis bakteri yang ditemukan kemungkinan akibat pengaruh lingkungan dan peralatan yang digunakan dalam produksi semen beku. Patel *et al.*, (2012) melaporkan jumlah koloni bakteri semen beku sapi FH $1,62 \times 10^2$ cfu/mL. Namun, pada penelitian Patel *et al.* (2011) pada sapi *crossbred* ditemukan jumlah koloni bakteri lebih tinggi yaitu sebesar 1,26 sampai dengan $5,90 \times 10^4$. Zampieri *et al.* (2013) melaporkan bahwa ditemukan bakteri di dalam semen beku sapi yaitu *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. (*kobei*, *asburiae*, *hormaechei*), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecium*, *Candida parapsilosis*.

Penelitian ini menemukan penurunan jumlah bakteri pada semen beku yang menggunakan antibiotik kombinasi PS dengan menggunakan antibiotik GTLS. Penggunaan antibiotik GTLS menunjukkan jumlah bakteri yang lebih rendah dibandingkan dengan kombinasi PS. Yániz *et al.* (2010) menyatakan bahwa PS yang digunakan dalam pengencer semen pada beberapa bakteri telah mengalami resisten sebanyak 13%. Shin *et al.* (1988) melaporkan bahwa antibiotik gentamisin,

linkomisin dan spektinomisin merupakan antibiotik *broad spectrum* dan lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif pada semen sapi. Keberadaan bakteri yang ada di dalam semen beku dapat disebabkan pada saat semen beku diproses, dikemas dan dibekukan (Andrabi *et al.*, 2016). Beberapa bakteri dapat *survive* di dalam pembekuan dan mampu bertahan hidup dalam penyimpanan pada suhu -196°C (Bielanski, 2012; Tedeschi dan De Paoli, 2011).

SIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa pada semen segar, pengencer yang digunakan untuk pembekuan dan semen beku ditemukan bakteri yang umum terdapat pada lingkungan seperti bakteri *Klebsiella* sp., *Micrococcus* sp., dan *Pediococcus* sp. *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas diminuta* dan *Serratia Enterobacter cloacae* dan *Serratia plymutica*. Antibiotik PS dan GTLS mempunyai efektifitas yang sama dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan tidak memengaruhi kualitas semen.

SARAN

Bakteri yang ditemukan pada penelitian ini merupakan bakteri yang umum ditemukan pada lingkungan sehingga disarankan dilakukan penelitian lebih lanjut terkait identifikasi faktor faktor yang dapat menyebabkan keberadaan bakteri bakteri tersebut selama produksi semen beku.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Inseminasi Buatan, Lembang, Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor, dan Unit Reproduksi dan Rehabilitasi, Bagian Kebidanan dan Reproduksi, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor yang telah memberikan fasilitas selama penelitian ini dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

Abro SH, Abro R, Tunio MT, Rind R, Leghari RA, Khatri P, Kamboh AA. 2016. Effect of various antibiotics against the actinobacillus lignieresii, acinetobacter and citrobacter species isolated from the frozen semen of cattle. *Sindh Univ Res Jour (Sci Ser)* 48(2): 353-358.

Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Qadeer S, Iqbal R, Ullah N. 2013. Efficiency of ciprofloxacin for bacterial control, post-thaw quality, and In vivo fertility of buffalo spermatozoa. *Theriogenology* 80: 378-383

Andrabi SMH, Khan LA, Shahab M. 2016. Isolation of bacteria in semen and evaluation of antibiotics in extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrologia* 10: 1-9.

Bielanski A. 2012. A review of the risk of contamination of semen and embryos during cryopreservation and measures to limit cross-contamination during banking to prevent disease transmission in ET practices. *Theriogenology* 77: 467-482.

Brown GV, Schollum LM, Jarvis BDW. 1974. Microbiology of bovine semen and artificial breeding practices under New Zealand conditions. *NZ J Agric Res* 17: 431-442.

[BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2017. *Semen Beku- Bagian 1: Sapi*. Jakarta (ID): BSN.

Cowan ST, Barrow GI, Steel KJ, Feltham RKA. 1993. *Cowan and steel's manual for the identification of medical bacteria*. (3rd ed.). Cambridge UK: Cambridge University Press.

[DJPKH] Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2015. Laporan Tahunan; Ditjen Peternakan dan Kesehatan Hewan Tahun 2014. Jakarta. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.

Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PL. 2011. *Encyclopedia of dairy sciences*. Academic Press, UK.

Gloria A, Contri A, Wegher L, Vignola G, Dellamaria D, Carluccio A. 2014. The effects of antibiotic additions to extenders on fresh and frozen-thawed bull semen. *Anim Reprod Sci* 150: 15-23.

González-Marín C, Roy R, Lúpez-Fernández C, Diez B, Carabaño MJ, Fernández JL, Kjelland ME, Moreno JF, Gosálvez J. 2011. Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Anim Reprod Sci* 123: 139-148.

Hoyos-Marulanda V, Goularte KL, Martins KR, Voloski F, Redü JFM, Duval EH, Vieira AD, Mondadori RG, Lucia TJ. 2017. Bacterial resistance to antibiotics commonly included in extenders for cryopreserved bull semen. *Anim Reprod* 14(1): 225.

- Ibadin OK, Ibeh IN. 2008. Bacteriospermia and sperm quality in infertile male patient at University of Benin Teaching Hospital, Nigeria. *Malay J Microbiol* 4: 65-67.
- [Kementan] Kementerian Pertanian. 2016. Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia. Nomor 10/Permentan/Pk.210/3/2016 Tentang Penyediaan Dan Peredaran Semen Beku Ternak Ruminansia. Republik Indonesia.
- Martin LOM, Munoz EC, De Cupere F, Van Driessche E, Echemendia-Blanco D, Rodríguez JMM, Beeckmans S. 2010. Bacterial contamination of boar semen affect the litter size. *Anim Reprod Sci* 12: 95-104.
- Meena GS, Raina VS, Gupta AK, Mohanty TK, Bhakat, Abdullah M, dan Bishist R. 2015. Effect of preputial washing on bacterial load and preservability of semen in Murrah buffalo bulls, *Vet World* 8(6): 798-803.
- Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Grazia FM, Giannerini V, Collodel G. 2009. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 26: 47-56.
- Morrell JM, Wallgren M. 2014. Alternatives to antibiotics in semen extenders: a review. *Pathogens* 3: 934-946.
- Najee HB, Al-Shawii AM, Abd- Al Rahman LY. 2012. Bacterial Contamination of Imported Bulls Frozen Semen. *Al-Anbar J Vet Sci* 5(1): 54-62.
- Patel DY, Patel RK. 2012. Estimation of biochemical activities of microbial load isolated from the frozen semen of HF and HF crossbred cattle bulls. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 6(3): 328-339.
- Patel HV, Patel RK, Chauhan JB. 2011. Biochemical properties of microbial load in frozen semen of cattle. *Wayamba J Anim Sci* 3: 117-121.
- Perumal P, Kumar KT, Srivastava SK. 2013. Infectious causes of infertility in buffalo bull (*Bubalus bubalis*). *Buffalo Bull* 32(2): 71-82.
- Poeloengan M. 1985. Macam dan jumlah bakteri yang terdapat dalam semen pejantan sapi Brahman di Lembang, Bandung. *Media Peternakan* 10(1): 12-19.
- Qadeer S, Batool A, Mehboob K, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Ullah N, Iqbal R, Akhter S. 2013. Comparison of traditional antibiotic streptomycin with neomycin, polymyxin B, or colistin in extender for buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *J Appl Anim Res* 41(3): 289-293.
- Sannat C, Nair A, Sahu SB, Sahasrabudhe SA, Kumar A, Gupta AK, Shende RK. 2015. Effect of species, breed, and age on bacterial load in bovine and bubaline semen. *Vet World* 8(4): 461-466.
- Shin SJ, Lein DH, Patten V, Ruhnke HL. 1988. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 1. Control of Mycoplasmas, Ureaplasmas, Campylobacter fetus subsp. venerealis and Haemophilus somnus. *Theriogenology* 29(3): 577-591.
- Tedeschi R, De Paoli P. 2011. Collection and preservation of frozen microorganisms. *Methods Mol Biol* 675: 313-326.
- Thieber M, Guerin B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62: 233-251.
- Yániz JL, Marco-Aguado MA, Mateos JA, Santolaria P. 2010. Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15 °C. *Anim Reprod Sci* 122: 142-149.
- Zampieri D, Santos VG, Braga PA, Ferreira CR, Ballottin D, Tasic L, Basso AC, Sanches BV, Pontes JH, da Silva BP. 2013. Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the in vitro production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology* 80(4): 337-345.

