

Kadar Krioprotektan Gliserol dan *Dimethylsulfoxide* Terbaik pada Pengencer *Astaxanthin* Fosfat Kuning Telur Bebek Terhadap Kualitas Semen Beku Babi

(THE BEST LEVEL OF GLYCEROL AND DIMETHYLSULFOXIDE
CRYOPROTECTANT IN THE ASTAXANTHIN PHOSPHATE DUCK EGG YOLK
EXTENDER ON THE QUALITY OF BOAR FROZEN SEMEN)

¹Wayan Bebas, ²Wayan Gorda

¹Laboratorium Reproduksi Veteriner,

²Lab Ilmu Bedah Veteriner Veteriner.

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

Jln. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia 80234

E-mail w_bebas@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji penambahan krioprotektan gliserol dan *dimethylsulfoxide* (DMSO) pada pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek terhadap kualitas semen beku babi, Masing masing krioprotektan dibedakan konsentrasinya yaitu: 4%, 6%, 8%, 10%, 12% untuk pembekuan semen. Semen dikoleksi dari satu ekor babi pejantan *Landrace* kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen dibagi menjadi 10 tabung masing masing diencerkan dengan pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek lalu disimpan pada suhu 20°C selama 2 jam, dilakukan sentrifugasi selama 15 menit (2000 rpm) kemudian diambil peletnya dengan 1 mL supernatannya. Pelet diencerkan dengan pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek yang telah ditambahkan konsentrasi gliserol atau DMSO (4%, 6%, 8%, 10%, 12%). Semen dikemas dengan *straw* 0,5 mL dan dilakukan *equilibrasi* selama 2 jam (4°C). Dilakukan penganginan di atas uap N₂ cair selama 10 menit, lalu dicelupkan kedalam N₂ cair. Semen disimpan pada kontainer selama 24 jam lalu dilakukan pengamatan terhadap kualitas semen dengan terlebih dahulu melakukan *thawing*. Hasil penelitian menunjukkan krioprotektan gliserol dan DMSO tidak memberikan pengaruh nyata ($p>0,05$) terhadap kualitas semen beku, tetapi konsentrasi krioprotektan (4%, 6%, 8%, 10%, dan 12%) berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap kualitas semen beku. Gliserol dengan konsentrasi 4% menghasilkan kualitas semen beku paling baik, sedangkan DMSO dengan konsentrasi 6% menghasilkan kualitas semen beku paling baik.

Kata-kata kunci: gliserol; DMSO; kualitas semen beku babi

ABSTRACT

The aim of this study to examine the addition of cryoprotectant glycerol and dimethylsulfoxide (DMSO) in *astaxanthin* phosphate duck egg yolk on the quality of frozen boar semen. Each of the cryoprotectants distinguished its concentration ie : 4%, 6%, 8%, 10%, and 12% for freezing of semen. Semen was collected from one *Landrace* boar then performed macroscopically and microscopically. Semen was divided into 10 tubes each diluted with the duck egg yolk *astaxanthin* phosphate extender diluent then stored at 20°C for 2 hours, centrifugation for 15 minutes (2000 rpm) then taken the pellet with 1 ml of supernatant. The pellets were diluted with *astaxanthin* phosphate duck egg yolk extender containing various concentration (4, 6, 8, 10, and 12%). Semen was packed with 0.5 mL *straw* and performed *equilibration* for 2 hours (4°C). do aeration above liquid N₂ vapor for 10 minutes, then dipped in liquid N₂. Semen was stored in liquid nitrogen container for 24 hours, and then quality of spermatozoa was evaluated post *thawing*. The results of the study showed that addition of cryoprotectant glycerol and DMSO were no difference significant ($p>0,05$) on the quality of frozen semen, but cryoprotectant concentrations (4%, 6%, 8%, 10%, and 12%) significantly affected ($p<0.05$) the quality of frozen semen. Glycerol with a concentration of 4% produces the best quality frozen semen, whereas DMSO with a concentration of 6% produces the best quality frozen semen.

Keywords: glycerol; DMSO; quality of frozen pig semen

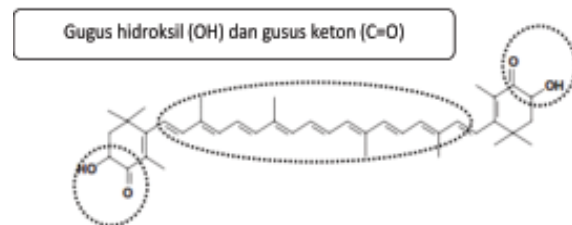
PENDAHULUAN

Semen babi mempunyai volume yang besar dan sangat peka terhadap kejutan dingin (*cold shock*) dibandingkan dengan semen hewan domestik lainnya (Gilmore *et al.*, 1996). Membran plasmanya sangat sensitif terhadap perubahan suhu selama proses penyimpanan pada suhu dingin. Hal ini sangat berkaitan dengan komposisi lipid dari membran plasma spermatozoa (Holt, 2000; Watson, 2000). *Docosapentaenoic acid* (DPA), dan *docosahexaenoic acid* (DHA) adalah asam lemak yang dominan dalam membran plasma spermatozoa babi, keduanya merupakan asam lemak tak jenuh ganda (Johnson dan Weitze, 2000). Selama proses pendinginan menurut Sikka (201), asam lemak tak jenuh ganda menurun secara dramatis akibat terjadi proses peroksidasi lipid, spermatozoa diserang oleh spesies oksigen reaktif atau ROS. Penambahan senyawa antioksidan dan beberapa asam lemak ke dalam pengencer dapat meminimalkan pembentukan ROS dan melindungi fungsi membran plasma (Peña *et al.*, 2003; Gadea *et al.*, 2004; Maldjian *et al.*, 2005).

Kuning telur adalah agen yang paling efektif untuk melindungi spermatozoa terhadap *cold shock*, karena dapat melindungi spermatozoa saat terjadi perubahan suhu dari suhu tubuh ke suhu ruang (28°C) dan kemudian penyimpanan pada suhu dingin (15°C). Khasiat utama kuning telur terutama terdapat pada kandungan lesitin (*phosphatidil cholin*) yang bersifat membran *coating* untuk tetap mempertahankan konfigurasi normal *phospholipid bilayer* yang merupakan susunan utama membran sel spermatozoa. Kuning telur juga mengandung fraksi *low-density lipoprotein* yang bertanggung jawab untuk perlindungan terhadap *cold shock* (Moussa *et al.*, 2002). Kuning telur dari berbagai jenis unggas seperti puyuh, ayam, dan bebek pernah digunakan sebagai bahan dasar pembuatan pengencer semen babi (Bebas dan Gorda, 2016), lebih lanjut dikatakan bahwa kuning telur bebek memberikan pengaruh yang paling baik terhadap kualitas semen babi selama penyimpanan.

Astaxanthin adalah antioksidan yang digolongkan kedalam kelas karotenoid yang disebut xantopil (Liu dan Osawa, 2007). *Astaxanthin* mempunyai struktur molekul yang sangat istimewa dengan kehadiran oksigen sebagai gugus hidroksil (OH), dan gugus karbonil (C=O) atau kombinasi keduanya (Oriza, 2013),

seperti disajikan pada Gambar 1. Kehadiran gugus fungsional hidroksil dan karbonil dalam ketokarotenoid (rantai poliena), membuat *astaxanthin* sebagai antioksidan yang berkekuatan tinggi (Hussein *et al.*, 2006; Liu dan Osawa, 2007).



Gambar 1 Struktur Molekul Astaxanthin (Oriza, 2013)

Astaxanthin mempunyai struktur yang unik dengan dua cincin terminalnya cenderung berorientasi pada/dekat permukaan membran sedangkan rantai poliena berfungsi di bagian dalam membran. Dengan demikian, *astaxanthin* bisa efektif dalam menanggulangi ROS di permukaan membran sementara rantai polienanya menghambat reaksi berantai oksidatif di bagian dalam membran. Oleh karena itulah *astaxanthin* merupakan antioksidan yang sangat baik melindungi seluruh komponen seluler dari kerusakan degeneratif dan serangan ROS (Oriza, 2013). Keberhasilan penambahan *astaxanthin* kedalam pengencer semen telah dilaporkan oleh beberapa peneliti seperti Indrawati *et al.* (2013) menambahkan pada pengencer semen ayam kampung, Bebas *et al.* (2015) menambahkan pada pengencer semen ayam hutan hijau.

Dalam proses pembekuan, spermatozoa mengalami perlakuan suhu yang ekstrim rendah, hingga mencapai -196°C yang berdampak buruk terhadap spermatozoa. Suhu rendah di bawah titik beku menyebabkan terjadinya perubahan fisik dan kimiawi di dalam sel, yang mendorong terbentuknya kristal-kristal es, meningkatnya konsentrasi elektrolit intrasel sehingga menyebabkan *coldshock* (Supriatna, 1993; Hafez dan Hafez, 2000). *Cold shock* mengakibatkan kerusakan pada membran sel baik membran plasma dan akrosoma, yang sangat berpengaruh terhadap motilitas, menyebabkan sel mengalami abnormal dan akhirnya mati. Untuk menanggulangi pengaruh negatif ini perlu ditambahkan beberapa zat kedalam pengencer seperti krioprotektan

(Supriatna, 1993; Boediono, 2006). Berdasarkan kemampuannya masuk ke dalam sel, krioprotektan diklasifikasikan menjadi dua yaitu krioprotektan intraseluler seperti : gliserol, dan DMSO, dan krioprotektan ekstraseluler seperti : lesitin pada kuning telur, sukrosa, glukosa, laktosa dan gula lain (Boediono, 1995). Krioprotektan intraseluler dapat melindungi sel dari dalam dengan jalan menyeimbangkan osmolalitas intra dan ekstrasel serta memodifikasi struktur permukaan kristal-kristal es sehingga tidak terlalu tajam. (Supriatna, 1993; Boediono, 2006).

Penambahan gliserol 3% dan *dimethylformamide* (DMF) 5% pada pengencer dasar air kelapa sebagai krioprotektan intraseluler pada pengencer semen babi telah dilaporkan oleh Silva *et al.*, 2015. Kim *et al.*, 2011 menggunakan gliserol 3% dan DMSO konsentrasi 5% dan 7% pada pengencer *Beltsville thawing solution* (BTS). Mapeka *et al.* (2009) menambahkan gliserol dengan konsentrasi 14%, DMSO 14% dan kombinasi gliserol 7% + DMSO 7% pada pengencer BTS. Bebas dan Laksmi (2014) menggunakan DMSO konsentrasi 6% pada pengencer fosfat kuning telur untuk membuat semen beku ayam hutan hijau. Konsentrasi krioprotektan yang ditambahkan sangat beragam tergantung dari bahan dasar pengencer yang digunakan. Penelitian ini mencoba menambahkan krioprotektan gliserol dan DMSO dengan konsentrasi masing masing 4%, 6%, 8%, 10%, dan 12% pada pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek terhadap kualitas semen beku babi *post thawing*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan satu ekor pejantan babi Landrace sehat berumur 1,5 tahun. Semen ditampung dengan metode *masage* (Hu *et al.*, 2006). Semen yang ditampung hanya fraksi kedua saja. Semen hasil penampungan ditempatkan pada penangas air/*water bath* (37°C) untuk dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi: volume, kekentalan, warna, bau, dan pH, sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi: konsentrasi, gerakan individu, gerakan massa, dan abnormalitas. Semen dengan kualitas baik dilakukan pengenceran dengan pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek. Kuning

telur bebek yang digunakan sebanyak 20% dari buffer fosfat, dengan penambahan antioksidan *astaxanthin* sebanyak 200 µg/mL pengencer. Ditambahkan antibiotik penisilin dan streptomisin masing masing: 1000 IU dan 1000 µg per mL pengencer (Bebas dan Gorda, 2016). Semen dibagi menjadi 10 tabung masing-masing diencerkan dengan pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek lalu disimpan pada suhu 20°C selama 2 jam, dilakukan sentrifugasi selama 15 menit (2000 rpm) kemudian diambil peletnya dengan 1 mL supernatannya. Pelet diencerkan dengan pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek yang telah ditambahkan konsentrasi gliserol dan DMSO masing masing 4%, 6%, 8%, 10%, 12%. Semen dikemas dengan *straw* 0,5 mL dan dilakukan equilibrasi selama 2 jam (4°C). Dilakukan penganginan di atas uap nitrogen (N₂) cair selama 10 menit, lalu mencelupkan kedalam N₂ cair. Semen disimpan pada kontainer selama 24 jam lalu dilakukan pengamatan terhadap kualitas semen (motilitas progresif, daya hidup, abnormalitas, dan membran plasma utuh) dengan terlebih dahulu melakukan *thawing*.

Pemeriksaan Motilitas Progresif (MP)

Pemeriksaan motilitas progresif dilakukan sesuai dengan Breininger *et al.* (2004) yaitu teteskan semen 0,05 mL di atas objek gelas hangat (37°C) tutup dengan cover gelas, amati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Dilakukan penghitungan spermatozoa yang mempunyai pergerakan yang progresif dihitung dalam satuan persen, pengamatan dilakukan terhadap lima lapang pandang

Penghitungan Daya Hidup (DH)

Penghitungan daya hidup spermatozoa dilakukan sesuai dengan Kvist dan Björndahl (2002), dengan pengecatan eosin-negrosin dibuat dengan mencampurkan 6,7 g/L Eosin Y dan 9 g/L negrosin dalam 9 g/L sodium chloride. Campurkan 50 µL semen dengan 50 µL eosin-negrosin lalu homogenkan. Setelah 30 detik dibuat preparat ulas lalu keringkan dengan cara dianginkan, diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 450 kali sebanyak 200 sel spermatozoa. Sel spermatozoa yang mati terlihat berwarna merah, sedangkan yang masih hidup tidak terwarnai/transparan. Hitung spermatozoa yang hidup dalam satuan persen.

Pemeriksaan Abnormalitas Spermatozoa (AS)

Abnormalitas spermatozoa pemeriksaannya sama seperti pemeriksaan daya hidup spermatozoa dengan pengecatan eosin-negrosin menurut Kvist dan Bjõrndahl (2002). Pemeriksaan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 450 kali sebanyak 200 sel spermatozoa. Sel yang mengalami bentuk abnormal baik di daerah kepala, badan dan ekor dihitung sebagai spermatozoa abnormal, dalam satuan persen.

Pemeriksaan Membran Plasma Utuh (MPU)

Pemeriksaan membran plasma utuh dilakukan dengan metode *Hypoosmotic swelling* (HOS) *test* (Zamfirescu, 2001). Larutan HOS terdiri dari: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL (100 mOsm/kg). Sebanyak 20 mL larutan HOS ditambahkan dengan 0,2 mL semen lalu dicampur hingga homogen, diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Dibuat preparat ulas tipis kemudian dievaluasi dengan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali terhadap 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan menggunakan *software* SPSS 25.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil evaluasi semen babi segar yang ditampung dengan metode *massage* disajikan pada Tabel 1.

Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen babi *landrace* mempunyai kualitas baik dan layak untuk diproses lebih lanjut. Hasil pemeriksaan volume, konsentrasi, dan motilitas progresif masing masing: 180 mL, 790×10^6 sel/mL, dan 80%. tidak jauh berbeda dengan yang dilaporkan Bebas dan Gorda (2016) dengan volume, konsentrasi, dan motilitas progresif masing masing: 170 mL, 800. 10^6 mL, dan 89%. Hasil ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Parasara *et al.* (2015) dan Tamoos *et al.* (2014). Parasara *et al.* (2015) memperoleh volume, konsentrasi, dan motilitas progresif masing masing: 212,4±10,95 mL; $261,0 \pm 56,80 \times 10^6$ sel/mL; dan 64,8±2,16%, sedangkan Tamoos *et al.* (2014) masing masing: 212±10,95 ML; $238 \pm 4,49 \times 10^6$ sel/ML; dan 78,00±2,74%. Hal ini disebabkan, semen yang ditampung hanya fraksi kedua saja (fraksi yang kaya spermatozoa) tanpa menampung fraksi pertama dan ketiga, sehingga volume semen yang didapat lebih sedikit tetapi mempunyai konsentrasi dan motilitas progresif yang jauh lebih tinggi. Khusus untuk babi, plasma semennya berdampak kurang baik terhadap kualitas semen karena mengandung protein yang mampu merusak lipid penyusun membran plasma sel, dan daya rusaknya sangat tergantung pada konsentrasi protein plasma tersebut (The'rien *et al.*, 1999).

Hasil pemeriksaan kualitas semen babi *Post Thawing* akibat pengaruh penambahan

Tabel 1. Kualitas semen segar babi *landrace*

Kualitas semen babi <i>landrace</i>		
Pemeriksaan Makroskopis	Kekentalan Semen	Agak encer
	Warna Semen	Putih krem
	Volume Semen (mL)	180
	Keasaman /pH	7,1
	Bau	Khas semen babi
Pemeriksaan Mikroskopis	Gerakan massa	++
	Konsentrasi (10^6 /ml)	790
	Pergerakan Progresif (%)	80
	Spermatozoa Hidup (%)	90
	Abnormalitas Spermatozoa (%)	9,0

Keterangan: ++ = Gerakan gelombang massa baik.

P = Gerakan individu sperma maju dan cepat.

berbagai konsentrasi krioprotektan gliserol dan DMSO disajikan pada Tabel 2.

Motilitas Progresif (MP)

Pada perlakuan gliserol konsentrasi 4% memberikan MP yang nyata lebih baik ($p < 0,05$) dibandingkan konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12%. Pada perlakuan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan MP yang paling baik jika dibandingkan dengan konsentrasi 4%, 8%, 10%, dan 12%. Penggunaan gliserol konsentrasi 4% dan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan MP yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Grafik *boxplot*nya disajikan pada Gambar 1.

Daya Hidup Spermatozoa (DH)

Pada perlakuan gliserol konsentrasi 4% memberikan DH yang nyata lebih baik ($p < 0,05$) dibandingkan konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12%. Pada perlakuan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan DH yang paling baik jika dibandingkan dengan konsentrasi 4%, 8%, 10%, dan 12%. Penggunaan gliserol konsentrasi 4% dan DMSO dengan konsentrasi 6% menghasilkan DH yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Grafik *boxplot* disajikan pada Gambar 2

Abnormalitas

Pada perlakuan gliserol konsentrasi 4% menghasilkan abnormalitas yang jauh lebih sedikit ($p < 0,05$) dibandingkan konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12%. Pada perlakuan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan abnormalitas yang paling sedikit jika dibandingkan dengan konsentrasi 4%, 8%, 10%, dan 12%. Penggunaan gliserol konsentrasi 4% dan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan abnormalitas spermatozoa yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Grafik *boxplot* disajikan pada Gambar 3.

Membran Plasma Utuh (MPU)

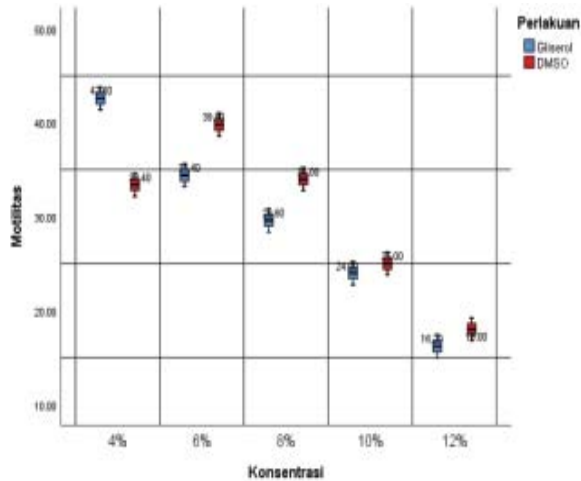
Pada perlakuan gliserol konsentrasi 4% memberikan MPU yang nyata lebih banyak ($p < 0,05$) dibandingkan konsentrasi 6%, 8%, 10% dan 12%. Pada perlakuan DMSO dengan konsentrasi 6% menghasilkan MPU yang paling banyak jika dibandingkan dengan konsentrasi 4%, 8%, 10%, dan 12%. Penggunaan gliserol konsentrasi 4% dan DMSO dengan konsentrasi 6% menghasilkan MPU yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Grafik *boxplot* disajikan pada Gambar 4

Permasalahan dalam penyimpanan semen pada suhu rendah (3° sampai minus 196°C) adalah terjadinya proses yang disebut kejutan dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membran plasma sel, menyebabkan sel menjadi abnormal, dan berakibat kematian sel. Untuk meminimalkan pengaruh buruk tersebut dilakukan menambahkan krioprotektan (Supriatna dan Pasaribu, 1993). Krioprotektan adalah senyawa yang ditambahkan pada spermatozoa untuk mengurangi efek merusak yang diakibatkan oleh pembekuan atau pencairan kembali (*thawing*). Berdasarkan kemampuannya masuk ke dalam sel, krioprotektan diklasifikasikan menjadi dua yaitu krioprotektan intraseluler seperti: gliserol dan DMSO, krioprotektan ekstraseluler seperti: lesitin pada kuning telur. Krioprotektan intraseluler dapat melindungi sel dari dalam dengan jalan menyeimbangkan osmolalitas intra dan ekstrasel serta memodifikasi struktur permukaan kristal-kristal es menjadi tidak terlalu tajam sehingga tidak merusak sel (Boediono, 2006).

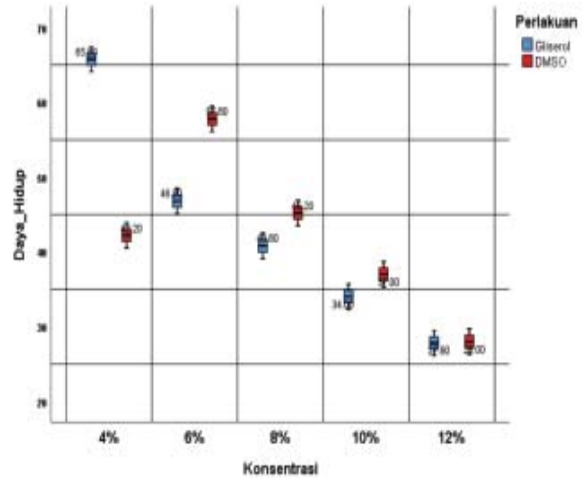
Tabel 2. Rataan kualitas semen babi *post thawing* akibat pengaruh penambahan berbagai konsentrasi krioprotektan gliserol dan *dimethyl sulfoxide* (DMSO)

Kualitas Semen	Krioprotektan									
	Gliserol					DMSO				
	4%	6%	8%	10%	12%	4%	6%	8%	10%	12%
Motilitas	42,60	34,40	29,60	24,00	16,20	33,40	39,80	34,00	25,00	18,00
Progresif	±1,34 ^b	±1,14 ^a	±1,14 ^a	±1,58 ^a	±1,30 ^a	±1,14 ^a	±0,83 ^b	±1,22 ^a	±2,00 ^a	±1,58 ^a
Daya Hidup	65,80	46,80	40,80	34,00	27,80	42,20	57,80	45,20	37,00	28,00
	±1,09 ^b	±2,04 ^a	±0,83 ^a	±2,54 ^a	±1,48 ^a	±1,92 ^a	±2,16 ^c	±1,92 ^a	±1,87 ^a	±2,12 ^a
Abnormalitas	27,60	31,80	36,80	41,20	44,20	33,00	29,40	34,80	37,80	41,20
	±1,14 ^b	±1,78 ^a	±1,78 ^a	±1,92 ^a	±0,83 ^a	±2,00 ^a	±1,14 ^b	±1,30 ^a	±1,64 ^a	±1,30 ^a
Membran Plasma Utuh	53,80	37,46	33,00	24,40	18,00	32,60	50,20	35,40	27,80	21,80
	±3,36 ^b	±2,40 ^a	±2,44 ^a	±2,30 ^a	±1,58 ^a	±1,94 ^a	±1,48 ^b	±1,14 ^a	±1,92 ^a	±1,30 ^a

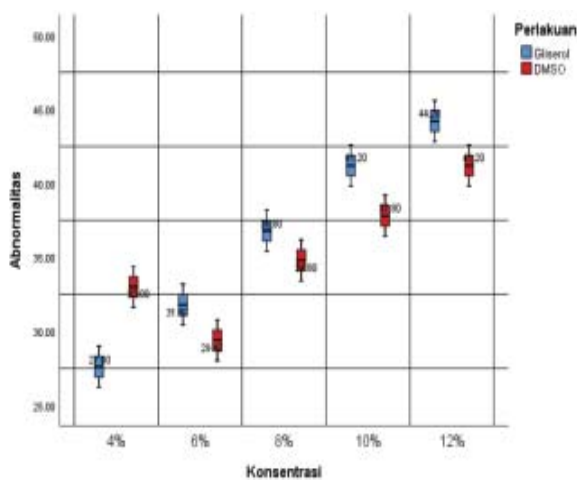
Keterangan: Huruf superskrip yang sama kearah baris menunjukkan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$)



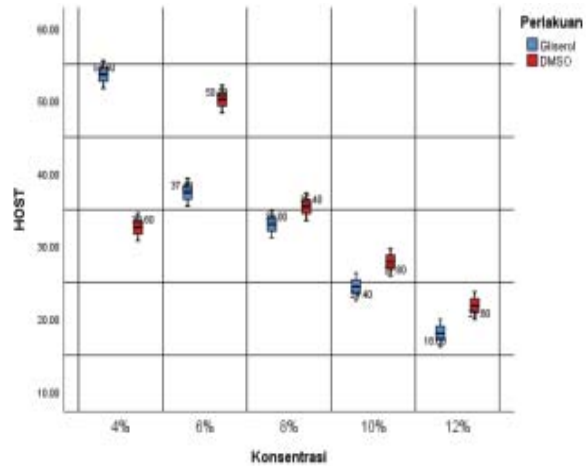
Gambar 1. Rataan motilitas progresif pada *boxplot* dengan selang kepercayaan 95% yang ordinatnya saling berpotongan menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$), sedangkan yang ordinatnya tidak saling berpotongan menunjukkan berbeda nyata ($p<0,05$)



Gambar 2. Rataan daya hidup spermatozoa pada *boxplot* dengan selang kepercayaan 95% yang ordinatnya saling berpotongan menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$), sedangkan yang ordinatnya tidak saling berpotongan menunjukkan berbeda nyata ($p<0,05$)



Gambar 3. Rataan abnormalitas spermatozoa pada *boxplot* dengan selang kepercayaan 95% yang ordinatnya saling berpotongan menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$), sedangkan yang ordinatnya tidak saling berpotongan menunjukkan berbeda nyata ($p<0,05$)



Gambar 4. Rataan membran plasma utuh spermatozoa pada *boxplot* dengan selang kepercayaan 95% yang ordinatnya saling berpotongan menunjukkan tidak berbeda nyata ($p>0,05$), sedangkan yang ordinatnya tidak saling berpotongan menunjukkan berbeda nyata ($p<0,05$).

Penggunaan krioprotektan intraseluler gliserol atau DMSO pada pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek memberikan pengaruh yang sama baiknya ($p > 0,05$) terhadap kualitas semen beku babi *post thawing*, namun faktor konsentrasi memberikan pengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap kualitas semen. Pada penelitian ini penambahan gliserol dengan konsentrasi 4% memberikan kualitas semen paling baik, sedangkan untuk DMSO dengan konsentrasi 6% memberikan hasil yang paling baik.

Penambahan gliserol 4% pada pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek menghasilkan kualitas semen *post thawing* terbaik dibandingkan konsentrasi 6%, 8%, 10%, dan 12% dengan MP spermatozoa $42,60 \pm 1,3\%$, sedangkan dengan penambahan DMSO konsentrasi terbaik adalah 6% dengan MP spermatozoa: $39,80 \pm 0,83\%$. Konsentrasi gliserol 4% dan DMSO 6% dapat menyeimbangkan osmolalitas intra dan ekstrasel serta memodifikasi struktur permukaan kristal-kristal es menjadi tidak terlalu tajam sehingga tidak merusak sel. Penelitian ini menghasilkan MP yang lebih baik, jika dibandingkan dengan penelitian yang dilaporkan oleh Katerina-Foeh *et al.* (2017) yang menggunakan glycerol 5% pada pengencer BTS® dan MII® menghasilkan MP spermatozoa babi *post thawing* masing masing $14,21 \pm 1,43\%$ dan $15,67 \pm 0,35\%$; sementara itu Kim *et al.* (2011) menggunakan DMSO konsentrasi 5% pada pengencer laktosa kuning telur menghasilkan MP sebanyak $23,00 \pm 5,61\%$. Penelitian yang memberikan hasil yang hampir sama dilakukan oleh Blanch *et al.* (2014) dengan melakukan penambahan gliserol 5% pada pengencer dasar kuning telur menghasilkan MP spermatozoa 34,32% dan kemudian dilakukan penambahan *Cholesterol-loaded Cyclodextrin* pada pengencer kuning telur menghasilkan MP sebanyak 41,00%.

Daya hidup spermatozoa babi *post thawing* yang paling baik dengan penambahan gliserol konsentrasi 4% dan DMSO 6% masing masing: $65,80 \pm 1,09\%$ dan $57,80 \pm 2,16\%$. Hasil penelitian ini hampir sama seperti yang dilakukan oleh Kim *et al.* (2011) dengan menambahkan DMSO konsentrasi 5% pada pengencer laktosa kuning telur menghasilkan daya hidup sebanyak $60,82 \pm 9,24\%$. Hasil penelitian ini jauh lebih baik dari yang dilaporkan Katerina-Foeh *et al.* (2017) menggunakan glycerol 5% pada pengencer BTS® dan MII® menghasilkan daya hidup masing masing: $34,62 \pm 0,63\%$ dan $29,96 \pm 0,97\%$.

Abnormalitas spermatozoa babi *post thawing* pada penambahan gliserol dengan konsentrasi 4% dan juga penambahan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan abnormalitas sel yang paling sedikit masing masing: $27,60 \pm 1,14\%$ dan $29,40 \pm 1,14\%$. Penelitian ini menghasilkan abnormalitas sel yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan Kim *et al.* (2011) dengan menambahkan DMSO dengan konsentrasi 5% pada pengencer laktosa kuning telur sebesar $36,10 \pm 1,03\%$

Membran plasma utuh spermatozoa babi *post thawing* pada penambahan gliserol konsentrasi 4% dan DMSO konsentrasi 6% menghasilkan MPU terbaik masing-masing: $53,80 \pm 3,35\%$ dan $50,20 \pm 1,48\%$. Hasil penelitian ini lebih baik dari yang dilakukan Kim *et al.* (2011) dengan menambahkan DMSO konsentrasi 5% pada pengencer laktosa kuning telur menghasilkan MPU sebesar $30,19 \pm 2,98\%$. Blanch *et al.* (2014) menambahkan gliserol 5% pada pengencer dasar kuning telur menghasilkan MPU sebanyak 45,58

Keberhasilan proses pembekuan semen sangat tergantung pada pengencer yang digunakan, pengaturan suhu baik saat pendinginan, pembekuan, penyimpanan, pencairan, dan juga memanipulasi pengeluaran air untuk menghindari terbentuknya kristal es dengan menggunakan berbagai krioprotektan (ektra dan intra seluler) dengan memodifikasi konsentrasinya. Setiap peneliti selalu berusaha untuk menghasilkan kualitas semen yang berkualitas dengan menyinkronkan faktor-faktor yang berpengaruh di atas.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan krioprotektan pada pengencer *astaxanthin* fosfat kuning telur bebek untuk semen beku babi perlu penambahan krioprotektan gliserol dengan konsentrasi 4% atau DMSO dengan konsentrasi 6%.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian, yang menggunakan krioprotektan selain gliserol dan DMSO untuk mendapatkan kualitas semen babi *post thawing* yang lebih baik. Semen beku ini perlu dilakukan pengujian terhadap fertilitas dan *litter size* yang dihasilkan untuk itu perlu ditindak lanjuti dengan melakukan inseminasi buatan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari Hibah Unggulan Program Studi, Universitas Udayana tahun Anggaran 2017. Penulis berterimakasih kepada LPPM Universitas Udayana yang telah memfasilitasi pelaksanaan proyek hibah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Bebas W, DNDI Laksmi DNDI. 2014. Pengaruh berbagai konsentrasi dimethylsulfoxide terhadap kualitas semen beku ayam hutan hijau post thawing. *Veterinary Science and Medicine Journal* 2(2): 105-115
- Bebas W, Pemayun TGO, Damriyasa IM, Astawa INM. 2015. Lactose-astaxanthin increases green jungle fowl's sperm motility and reduces sperm DNA fragmentation during 5° Celsius storage. *Bali Medical Journal* 4(3): 152-156
- Bebas W, GorDa W. 2016. Penambahan astaxanthin pada pengencer kuning telur berbagai uenis Unggas dapat memproteksi semen babi selama penyimpanan. *Jurnal Veteriner* 17(4): 484-491
- Blanch E, Tomas C, Hernandez M, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM, and Moce E. 2014. Egg Yolk and Glycerol Requirements for Freezing Boar Spermatozoa Treated with Methyl β -Cyclodextrin or Cholesterol-loaded Cyclodextrin. *Journal of Reproduction and Development* 60(2): 143-149
- Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM. 2004. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63: 2126-2135.
- Boediono A. 1995. Use of the recent animal reproduction biotechnology for improvement of animal production and quality. *Inovasi* 6: 26-23.
- Boediono A. 2006. *Kriopreservasi dan viabilitas embrio in vitro*. Modul pemanfaatan bioteknologi embrio pada hewan laboratorium sebagai model dalam penelitian biologi perkembangan dan produksi bahan biologis. Pelatihan Dosen Universitas/Perguruan Tinggi. Bogor, 28 Agustus – 4 September 2006.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation, effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extender. *Theriogenology* 62: 690-701.
- Gilmore JA, Junying D, Jun T, Peter AT, Crister JK. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to Cryopreservation. *J Reprod Fertil* 107: 87-95
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Kiawah Island, South Carolina, USA.
- Holt WV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
- Hu JH, Qing Li W, Li G, Chen XY, Yang H, Zhang SS, and Wang LQ. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Aust. J Anim Sci* 19(4): 486-494
- Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 69(3): 443-449.
- Indrawati D, Bebas W, Trilaksana IGST. 2013. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung dengan penambahan astaxanthin pada suhu 3-5°C. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(4): 445-452.
- Johnson, LA, Weitze KF. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62: 143-172.
- Katerina-Foeh NDF, Arifiantini RI, Yusuf TL. 2017. The quality of boar frozen semen diluted in BTS® and MII® with different cryoprotectant supplemented with sodium dodecyl sulphate. *Jurnal Kedokteran Hewan* 11(1): 6-10.
- Kim S, Lee YJ, Ji DB, Kim YJ. 2011. Evaluation of different cryoprotectants (CPAs) in boar semen cryopreservation. *J Vet Med Sci* 73(7): 961-963
- Kvist U, Bjoërndahl L. 2002. Editorial. in: Kvist U, Bjoërndahl L, eds. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford, United Kingdom. Oxford University Press.

- Liu X, Osawa T. 2007. *Cis* astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-*trans* isomer. *Biochem Biophys Res Commun* 357(1): 187-93.
- Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63: 411-421.
- Mapeka MH, Lehloenya KC, Nedambale TL, Sutherlang B (2009). Effect of cryoprotectant on the cryopreservation of South Africa colbroek pig semen. *South African Journal of Animal Science* 39(1): 198-201.
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective Effect on Frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706
- Oriza. 2013. Astaxanthin. Natural antioxidant for neuro-protection, vision, enhancement & skin rejuvenation. Oryza oil & FAT Chemical Co.LTD. www.oryza.co.jp/html/english/pdf/astaxanthin%20ver202.1.pdf. Tanggal akses 12/6/2013.
- Parasaara IGNAM, Sumardani NLG, Suranjaya IG. 2015. Korelasi ukuran testes terhadap produksi dan kualitas semen cair babi landrace dalam rangkaian inseminasi buatan. *Peternakan Tropika* 3(1): 93-104.
- Penã FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 78: 85-98.
- Sikka SC. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function (Review). *Current Med Chem* 8(7): 851-862.
- Silva CG, Cunha ER, Blume GR, Malaquias JV, Bao SN, Martin CF. 2015. Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalosa. *Cryobiologi* 70: 90-94
- Supriatna I, Pasaribu FH. 1993. In vitro fertilisasi, transfer embrio, dan pembekuan embrio. Bogor. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor.
- Tamoes JA, Nalley WN, Hine TM. 2014. Fertilitas spermatozoa babi Landrace dalam pengencer modifikasi zorlesco dengan susu kacang kedelai. *Sains Peternakan* 12(1): 20-30.
- The'rien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid eflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61: 590-598.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 61: 481-492
- Zamfirescu S, Ciupina Victor C, Nadolu Dorina N. 2001. Utilizarea testului hipoosmotic pentru evaluarea integritatii functionale a membrane spermatozoizilor de berbec dupa congelare- decongelare. *Bul SNBC* 29: 248