

## Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Metode *Water Jacket* dan *Free Water Jacket*

(SPERMATOZOA VIABILITY OF LIMOUSIN CATTLE PRESERVED  
WITH WATER JACKET AND FREE WATER JACKET METHOD)

Indriani<sup>1</sup>, Trinil Susilawati<sup>2</sup>, Sri Wahyuningsih<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan,

<sup>2</sup> Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya,  
Jalan Veteran, Malang 65145, Telepon 0341-553531

Email : Indriani\_lea@yahoo.co.id

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode simpan yang berbeda yaitu penyimpanan dengan menggunakan *water jacket* dan *free water jacket* terhadap kualitas semen sapi limousin setelah disimpan pada suhu 5°C. Semen yang digunakan dengan kriteria motilitas  $\geq ++$  dikoleksi dua kali seminggu. Semen dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis lalu diencerkan dengan perbandingan 1 : 1 menggunakan pengencer *Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) ditambahkan kuning telur 10%. Disimpan di lemari es suhu 5°C dan kualitas semen diamati sesaat setelah pengenceran, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan dengan metode *free water jacket* lebih baik dalam mempertahankan persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh spermatozoa

Kata kunci : spermatozoa, semen cair, metode penyimpanan

### ABSTRACT

This study aimed to determine the effect of different methods of saving the storage by using a water jacket and a free water jacket to quality semen Limousin cattle after being stored at a temperature of 5°C. Semen used the criteria motility  $\geq ++$  collected two times a week. Semen evaluated macroscopically and microscopically and diluted in the ratio 1: 1 using the *Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) diluent added 10% egg yolk. Stored in the refrigerator temperature 5°C and semen quality was observed immediately after dilution, 1 hour, 2 hours, 3 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours. The results showed that the method of free storage waterjacket better in maintaining the percentage of motility, viability, abnormality and plasma membrane intact spermatozoa

Key words: spermatozoa, liquid semen, storage methods

### PENDAHULUAN

Salah satu cara untuk meningkatkan mutu genetik dan produktivitas ternak adalah melalui penerapan bioteknologi reproduksi yaitu inseminasi buatan (IB). Berhasilnya program IB sangat bergantung pada kualitas semen yang diejakulasikan pejantan. Semen sesudah pengenceran harus segera disimpan apabila tidak langsung digunakan, guna mempertahankan daya fertilitasnya.

Penyimpanan semen di lemari es merupakan salah satu alternatif guna memperpanjang daya hidup spermatozoa. Semen cair yang disimpan pada suhu 5°C mampu bertahan selama 3-4 hari (Priastomo *et al.*, 2009). Penyimpanan semen di lemari es pada suhu 5°C dapat dilakukan dengan metode *water jacket* dan metode *free water jacket*. *Water jacket* yaitu penambahan air pada beker gelas sebagai tempat menaruh tabung reaksi yang sudah berisi semen sesudah diencerkan. Metode *free water jacket* yaitu

penyimpanan semen di lemari es yang diletakkan secara bebas tanpa penambahan media air. Menurut Yusuf *et al.*, (2006) penyimpanan dengan bantuan media air, menciptakan lingkungan mikro yang stabil sehingga mampu beradaptasi terhadap perubahan suhu drastis yang dapat mengakibatkan *cold shock* (Watson 1996; Chun-Xia dan Zeng-Ming, 2000).

Proses penyimpanan memerlukan pengencer yang mengandung zat makanan dan mempunyai sifat melindungi spermatozoa sehingga dapat bertahan dalam periode penyimpanan yang lebih lama (Aboagla dan Terada, 2004). *Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) merupakan pengencer yang mempunyai komposisi ionik hampir sama dengan cairan kauda epididimis sapi yang dikembangkan oleh Verbercmoes *et al.*, (2004) dengan komposisi ion, pH, osmolaritas meniru kondisi plasma kauda epididimis sapi. Hasil penelitian Ducha (2012) mengenai penggunaan pengencer CEP-2, penambahan kuning telur 10% mampu memberikan kualitas spermatozoa terbaik dalam mempertahankan motilitas dan menimalisir kerusakan membran spermatozoa.

Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi integritas sel spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C dengan mempertahankan integritas selubung lipoprotein, selain itu glukosa dalam kuning telur menguntungkan spermatozoa karena adanya daya viskositas (Said *et al.*, 2005)

*Bovine Serum Albumin* (BSA) adalah protein *albumin* yang diperoleh dari sapi, kandungan albumin dalam senyawa BSA yaitu 100mg/mL (Sasongko *et al.*, 2010). Senyawa BSA memiliki kelebihan dapat menghilangkan asam lemak membran secara ekstensif namun tidak berpengaruh terhadap protein dan fosfolipid membran. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh metode simpan yang berbeda yaitu penyimpanan dengan menggunakan *water jacket* dan *free water jacket* terhadap kualitas spermatozoa (motilitas individu, viabilitas spermatozoa, abnormalitas spermatozoa, dan integritas membran utuh sapi limousin yang dipreservasi pada suhu 5°C.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB)

Singosari Malang dan Laboratorium Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya Malang.

Sampel yang digunakan yaitu semen segar sapi limousin yang dipelihara di BBIB Singosari dengan kriteria motilitas massa  $\geq ++$ , motilitas individu  $\geq 70\%$ . Sapi limousin yang digunakan berumur sekitar tiga tahun dan bobot badan sekitar 750 kg. Frekuensi penampungan semen dua kali per minggu.

### Penyimpanan *Water Jacket* dan *Free Water Jacket*

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK). Ulangan untuk setiap perlakuan adalah sepuluh kali yaitu jumlah ejakulat dengan jarak penampungan 3-5 hari. Perlakuan yang dilakukan adalah sebagai berikut : 1) *Waterjacket* yaitu penyimpanan spermatozoa di lemari es dengan penambahan air suhu 30°C pada beker gelas sebagai tempat menaruh tabung reaksi yang sudah berisi semen; 2) *Free waterjacket* yaitu penyimpanan spermatozoa di lemari es yang diletakan secara bebas tanpa penambahan media air.

Semen hasil kelola dievaluasi sesaat setelah pengenceran, 1 jam, 2 jam, 3 jam, 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Indikator kualitas spermatozoa meliputi progresif motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran utuh.

Pengencer yang disiapkan adalah CEP-2 yang ditambahkan kuning telur dengan konsentrasi 10%. Setelah ditambah kuning telur larutan *distirer* selama 30 menit. Selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung reaksi, pada hari pertama larutan disentrifugasi dua kali selama 30 menit dengan kecepatan 1500 rpm, dimasukkan ke refrigerator dan keesokan harinya *distirer* kembali sebanyak dua kali selama 30 menit dengan kecepatan 1500 rpm didiamkan selama dua hari dalam refrigerator, kemudian ditambahkan BSA 2 mg/L.

### Pemeriksaan Kualitas Semen Segar Pemeriksaan makroskopis

Pemeriksaan makroskopis meliputi : 1) pH : diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus, selanjutnya dilihat pH semen dengan menggunakan pH paper, pH normal semen 6,4-7,8 (Garner dan Hafez, 2008); 2) Warna : Diamati secara visual setelah penampungan, semen yang baik adalah krem (Ax *et al.*, 2008); 3) Konsistensi : Diamati dengan

memiringkan tabung penampung kemudian ditegakkan kembali, bila semen turunnya lambat berarti konsentrasinya tinggi dan jika turunnya cepat berarti konsentrasinya rendah (Garner dan Hafez, 2008).

### Pemeriksaan mikroskopis

**Motilitas Massa.** Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan pada semen segar. Motilitas massa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya. Semen diletakkan di atas gelas objek tanpa *cover glass* dengan perbesaran 100×. Kriteria penilaian massa spermatozoa sangat baik (+++) terlihat adanya gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bergerak. Dinilai baik (++) terdapat gelombang-gelombang kecil tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban. Dinilai cukup (+), bila tidak terlihat gelombang melainkan gerakan-gerakan individual aktif progresif dan buruk (0), bila tidak ada gerakan sama sekali (Susilawati, 2011).

**Motilitas Individu.** Gerak individu spermatozoa dapat diamati dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Selapis tipis semen dibuat di atas gelas objek yang ditutupi dengan gelas penutup. Kriteria motilitas spermatozoa menurut Susilawati (2012) adalah sebagai berikut :0% :spermatozoa immotil tidak bergerak; 50% : spermatozoa bergerak melingkar, kurang dari 50% bergerak progresif dan tidak bergelombang; 50-80% : spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa; 90% : gerakan progresif yang gesit dan membentuk gelombang; 100% : gerakan sangat progresif dan gelombang sangat cepat

**Viabilitas dan Abnormalitas Spermatozoa.** Viabilitas dan abnormalitas spermatozoa, diamati berdasarkan pewarnaan diferensial dengan menggunakan pewarna eosin-negrosin. Satu tetes semen diletakan pada gelas objek ditambah satu tetes eosin dipermukaan salah satu gelas objek. Selanjutnya diaduk pelan-pelan campuran tersebut sampai rata, kemudian diulas menggunakan gelas objek yang lain ke salah satu ujung gelas objek sehingga terbentuk satu lapisan tipis (*film*) cairan semen pada permukaan gelas objek sampai lapisan mengering. Preparat tersebut diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Spermatozoa pada saat preparat dibuat masih dalam keadaan hidup akan berwarna putih sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah karena menyerap warna Eosin

(Evans dan Maxwell, 1987; Susilawati 2011). Jumlah spermatozoa hidup dan mati dihitung dari 200 sel spermatozoa. Cara perhitungan persentase viabilitas dan abnormalitas spermatozoa diperoleh dengan menggunakan rumus (Evans and Maxwell, 1987) :

$$\text{Viabilitas spermatozoa} = p \times (p + q)^{-1} \times 100\%$$

keterangan :

p = jumlah spermatozoa hidup

q = jumlah spermatozoa mati

$$\text{Abnormalitas spermatozoa} = a \times (a + b)^{-1} \times 100\%$$

keterangan :

a = jumlah spermatozoa abnormal

b = jumlah spermatozoa normal

**Konsentrasi spermatozoa.** Evaluasi terhadap konsentrasi dilakukan dengan menggunakan pipet *haemocytometer* dan kamar hitung Neubauer. Semen diisap sampai skala 0,5 kemudian ditambah dengan larutan NaCl 3% dan diisap sampai mencapai angka 1,01. Larutan dalam pipet digoyang-goyang membentuk angka delapan selama 2-3 menit agar larutan homogen, selanjutnya larutan tersebut dibuang beberapa tetes. Setelah itu semen ditetaskan pada kamar hitung Neubauer yang ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Menghitung spermatozoa yang terdapat di dalam lima kotak dengan arah diagonal. Hasil perhitungan konsentrasi spermatozoa dalam jumlah kamar yang dihitung lima kotak dengan 80 ruangan kecil di dalamnya dikalikan  $10^7$  per milliliter (Moussa *et al.*, 2002; Susilawati, 2011)

**Integritas Membran Spermatozoa.** Pemeriksaan integritas membran spermatozoa diuji dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Urutan kerja HOST diaplikasikan berdasarkan modifikasi dari beberapa referensi seperti yang ditulis Susilawati (2011) sebagai berikut. Sebanyak 1 mL larutan hypoosmotic 150 m osmol (7,35 g natrium sitrat  $2H_2O$ , 13,52 g fruktosa dilarutkan dalam 1000 mL aquades) dan memasukkan ke dalam tabung reaksi, menambahkan 0,1 mL semen ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan hypoosmotik tadi kemudian diinkubasi pada suhu  $37^\circ C$  selama 30 menit. Setelah inkubasi, sampel semen diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x

dengan cara mengambil satu tetes semen sebagai sampel. Ekor spermatozoa yang melingkar mengidentifikasi keutuhan plasma membrannya.

### Pengenceran Semen

Proses pengenceran semen dilakukan setelah memenuhi persyaratan layak diproses lebih lanjut. Pengenceran semen dilakukan dengan cara menambahkan semen ke dalam tabung yang telah berisi pengencer CEP-2 + 10% kuning telur, secara bertahap sedikit demi sedikit dan kemudian menggoyang pelan-pelan agar larutan homogen. Kadar pengenceran semen dilakukan perbandingan 1 : 1 dengan volume masing-masing 0,25 mL.

### Analisis Data

Data hasil penelitian berupa persentase ditransformasi ke arcus sinus (Yitnosumarto, 1993). Hasil transformasi selanjutnya dianalisis menggunakan sidik ragam untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kualitas spermatozoa. Jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan Uji Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Semen Segar

Terhadap semen segar dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui kualitas semen segar yang digunakan apakah memenuhi syarat untuk diencerkan, pengamatan lebih lanjut, dan untuk mengetahui perubahan yang terjadi setelah semen mengalami penyimpanan. Data hasil evaluasi semen segar yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segar sapi limousin

Parameter	Rataan $\pm$ SD
Warna	Putih kekuningan
Konsistensi	Kental
pH	7,00 $\pm$ 0,00
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	70,00 $\pm$ 0,00
Konsentrasi sperma- tozoa (10 <sup>6</sup> /ml)	1891,50 $\pm$ 447,70
Viabilitas (%)	96,66 $\pm$ 2,22
Abnormalitas (%)	6,84 $\pm$ 4,40
Integritas membran (%)	88,59 $\pm$ 3,74

Dari hasil pemeriksaan semen segar menunjukkan bahwa semen tersebut mempunyai kualitas yang baik dan memenuhi persyaratan untuk diencerkan. Hasil pengamatan semen segar yang diperoleh menunjukkan kondisi kental warna krem, yang berarti semen yang digunakan selama penelitian berkualitas baik. Derajat keasaman (pH) yang digunakan termasuk normal dengan rata-rata 7,00 hal ini sesuai dengan pH semen segar sapi umumnya berkisar 6,4-7,8 (Garner dan Hafez, 2008). Motilitas massa (++) dan motilitas individu 70% kualitas semen ini tergolong baik sesuai standar yang harus dipenuhi untuk diproses lebih lanjut adalah motilitas massa (++) sampai (+++) dan motilitas individu minimal 65%, karena motilitas yang tinggi akan meningkatkan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi (Pratiwi *et al.*, 2005).

Rataan konsentrasi semen segar yang digunakan adalah 1891,50  $\pm$  447,70 juta/mL, nilai konsentrasi tersebut tergolong normal, menurut Pineda (2003) berkisar antara 300-2000 juta/mL, dan menurut Shannon dan Vismanath (2000) berkisar 1000-2000 juta/mL. Persentase hidup spermatozoa yang diperoleh adalah 96,66  $\pm$  2,22%. Menurut Hafez (2008) semen segar yang akan diproses lebih lanjut seharusnya mengandung spermatozoa hidup minimal 80%. Persentase abnormalitas spermatozoa adalah 6,84  $\pm$  4,40%. Menurut Ax *et al.*, (2008) abnormalitas spermatozoa tidak boleh lebih dari 15% karena akan berpengaruh terhadap fertilitas. Rataan Membran Plasma Utuh (MPU) semen segar adalah 88,59  $\pm$  3,74%. Menurut Ravell dan Mrode (1994) nilai persentase membran plasma utuh semen segar yang kurang dari 60% dikategorikan sebagai semen yang infertil.

### Kualitas Spermatozoa Sapi Limousin Dengan Metode Penyimpanan Berbeda pada Suhu 5°C

Data hasil evaluasi kualitas spermatozoa setelah disimpan pada suhu 5°C dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa perlakuan metode *water jacket* dan *free water jacket* tidak memberikan pengaruh ( $P > 0,05$ ) terhadap motilitas spermatozoa. Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa perbedaan penurunan motilitas antara metode *water jacket* dan *free water jacket* yang sangat kecil. Dalam hal ini kemungkinan tidak terjadi *cold shock* meskipun dengan metode yang berbeda. Tampaknya hal ini terjadi karena

Tabel 2. Kualitas spermatozoa setelah disimpan pada suhu 5°C

Variabel	Perlakuan	Penyimpanan Jam ke-						
		0	1	2	3	24	48	72
Motilitas (%)	WJ	69,75 <sup>a</sup>	69,50 <sup>a</sup>	69,51 <sup>a</sup>	68,75 <sup>a</sup>	51,75 <sup>a</sup>	30,00 <sup>a</sup>	13,00 <sup>a</sup>
	FWJ	70,00 <sup>a</sup>	69,51 <sup>a</sup>	69,25 <sup>a</sup>	69,25 <sup>a</sup>	59,50 <sup>a</sup>	40,50 <sup>a</sup>	28,75 <sup>a</sup>
Viabilitas (%)	WJ	87,63 <sup>a</sup>	86,04 <sup>a</sup>	85,23 <sup>a</sup>	83,96 <sup>a</sup>	80,69 <sup>a</sup>	66,18 <sup>a</sup>	62,32 <sup>a</sup>
	FWJ	89,05 <sup>a</sup>	88,10 <sup>a</sup>	87,05 <sup>a</sup>	85,95 <sup>a</sup>	81,13 <sup>a</sup>	72,82 <sup>a</sup>	66,92 <sup>a</sup>
Abnormalitas (%)	WJ	12,18 <sup>a</sup>	12,68 <sup>a</sup>	16,07 <sup>a</sup>	18,01 <sup>a</sup>	19,47 <sup>a</sup>	20,33 <sup>a</sup>	28,33 <sup>a</sup>
	FWJ	10,45 <sup>a</sup>	11,22 <sup>a</sup>	14,35 <sup>a</sup>	15,72	18,61	19,33	20,17
MPU (%)	WJ	85,87 <sup>a</sup>	80,41 <sup>a</sup>	67,94 <sup>a</sup>	67,45 <sup>a</sup>	66,91 <sup>a</sup>	65,80 <sup>a</sup>	62,05 <sup>a</sup>
	FWJ	86,83 <sup>a</sup>	81,14 <sup>a</sup>	77,44 <sup>a</sup>	76,01 <sup>a</sup>	74,30 <sup>a</sup>	64,64 <sup>a</sup>	65,38 <sup>a</sup>

Ket: WJ : *Water Jacket*  
 FWJ : *Free Water Jacket*  
 MPU : Membran Plasma Utuh  
 a : Superskrip yang sama pada kotak yang sama tiap variable menunjukkan perlakuan tidak memberikan pengaruh yang nyata (P>0,05).

adanya peran komposisi dari pengencer yang mampu mencegah terjadinya *cold shock* sehingga mampu mempertahankan motilitas spermatozoa meskipun penyimpanan kering atau *free water jacket* (Verbackmoes *et al.*, 2004; Ducha 2012). Hal ini berbeda dengan penelitian Yusuf *et al.*, (2006) yang melaporkan bahwa penyimpanan metode *water jacket* lebih baik, karena penambahan media air menciptakan lingkungan mikro yang bisa beradaptasi terhadap perubahan suhu.

Hasil analisis sidik ragam diketahui bahwa perlakuan metode *water jacket* dan *free water jacket* tidak memberikan pengaruh nyata (P>0,05) terhadap viabilitas spermatozoa. Rataan viabilitas spermatozoa yang disimpan selama 72 jam menunjukkan metode *free water jacket* lebih baik dari metode *water jacket*. Lama waktu penyimpanan menyebabkan penurunan persentase hidup spermatozoa baik pada metode *water jacket* maupun *free water jacket*. Namun, tingkat penurunannya tidak sedrastis penurunan motilitas spermatozoa dalam mempertahankan viabilitas. Keadaan ini diduga karena pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu menyediakan lingkungan yang baik bagi spermatozoa dan melindungi membran sehingga permeabilitas membran tetap baik. Pengencer CEP-2 memiliki kondisi yang menyerupai kondisi plasma kauda epididimis sapi, serta peran dari kuning telur yang mengandung lipoprotein dan lesitin yang

mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa (Verberckmoes *et al.*, 2004; Susilawati, 2011). Penurunan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan lebih disebabkan oleh meningkatnya jumlah spermatozoa rusak dan mati akibat keterbatasan energi. Solihati *et al.*, (2008); Pareira *et al.*, (2010) menyatakan viabilitas akan menurun akibat suhu dingin, ketersediaan energi dalam pengencer makin berkurang dan menurunnya pH karena terjadi peningkatan asam laktat hasil metabolisme, adanya kerusakan membran plasma, dan akrosom. Tingkat kandungan asam laktat akan berkorelasi nyata dengan daya gerak spermatozoa dan memperpendek daya tahan hidup spermatozoa (Tambing *et al.*, 2000).

Hasil analisis sidik ragam pada jam ke 0 sampai jam ke 72 perlakuan metode *water jacket* dan *free water jacket* tidak memberikan pengaruh (P>0,05) terhadap abnormalitas spermatozoa. Berdasarkan Tabel 2 diketahui bahwa nilai abnormalitas spermatozoa yang dipreservasi pada suhu 5°C menunjukkan bahwa metode *free water jacket* memiliki nilai rata-rata abnormalitas yang lebih rendah (20,17%) dibanding dengan metode *water jacket* (28,23%). Hal ni menunjukkan bahwa adanya peran dari pengencer yang mampu menjaga abnormalitas spermatozoa meskipun dengan metode penyimpanan yang berbeda. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi



membran spermatozoa selama proses pendinginan sehingga dapat meminimalisir abnormalitas spermatozoa. Kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 mengandung lesitin dan lipoprotein yang dapat berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) (White, 1993; Aku *et al.*, 2007).

Uji integritas membran spermatozoa dilakukan dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Spermatozoa dengan membran utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau bengkok sebagai akibat masih berfungsinya membran dalam penyerapan cairan pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Spermatozoa yang mempunyai membran yang rusak tidak dapat menyesuaikan diri dengan tekanan osmotik, tidak mampu menahan air yang masuk, sehingga tidak menggelembung (Corea *et al.*, 1996).

Hasil analisis ragam menunjukkan, pada jam ke 0 sampai jam ke 72 perlakuan metode *water jacket* dan *free water jacket* tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap membran plasma utuh spermatozoa. Hal ini diduga karena keberadaan kuning telur dalam pengencer CEP-2 yang dapat memberikan perlindungan terhadap membran plasma spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C meskipun dengan metode penyimpanan yang berbeda. Hasil penelitian terdahulu menyatakan bahwa kuning telur yang terdapat dalam pengencer dapat melindungi membran spermatozoa dari *cold shock* selama penyimpanan pada suhu 5°C (Zhao *et al.*, 2009; Kulaksiz *et al.*, 2010).

Penurunan persentase membran plasma utuh diduga terjadi akibat adanya toksin yang bersumber dari spermatozoa mati dan terjadinya peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) sisa hasil metabolisme spermatozoa. Yulnawati dan Setiadi (2005) mengemukakan penurunan kualitas spermatozoa selama penyimpanan, baik persentase motilitas akibat toksin yang bersumber dari spermatozoa mati maupun yang berasal dari zat yang terkandung dari pengencer yang telah mengalami oksidasi dapat menyebabkan tingginya kadar radikal bebas, yang bisa merusak keutuhan membran plasma spermatozoa. Spermatozoa yang disimpan pada suhu 5°C maupun suhu beku akan mengakibatkan terjadinya perubahan stuktur sehingga rentan terhadap radikal bebas saat spermatozoa berkontak dengan oksigen (Sankai *et al.*, 2001; Kardivel, *et al.*, 2009).

## SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa metode penyimpanan *free water jacket* lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa, viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran spermatozoa dibanding metode *water jacket* yang dipreservasi pada suhu 5°C.

## SARAN

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh konsentrasi spermatozoa terhadap penyimpanan pada suhu 5°C dengan metode penyimpanan *water jacket* dan *free water jacket*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ketua penelitian unggulan Fapet Universitas Brawijaya yang telah mendanai semua biaya penelitian, dan kepada tim seksing atas bantuan dan kerja samanya selama ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EM, Terada T. 2004. Effect of Egg Yolk During the Freezing Step of Cryopreservation on the Viability of Goat spermatozoa. *Theriogenology* 62 : 1160-1172.
- Aku AS, Sandiah N, Sadsoeitoeboen PD, Amin MR, Herdis. 2007. Manfaat Lesitin Nabati pada Preservasi dan Kriopreservasi Semen. *Journal Animal Production* 9(1) : 49-52.
- Arifiantini Yusuf, TL, Purwantara B. 2006. Daya Tahan Spermatozoa Kuda Hasil Sentrifugasi dengan Kadar Plasma Semen yang Berbeda Menggunakan Pengencer Skim. *Jurnal Produksi Ternak* 8 : 160-167.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2008. *Semen Evaluation in farm Animal Reproduction*. 7<sup>th</sup> eds. Hafez, B, Hafez, ESE. Baltimore. 25: 365-375.
- Chun-Xia Z, Zeng-Ming Y, 2000. Evaluation on Sperm Quality of Freshly Ejaculated Boar Semen During *in Vitro* Storage Under Different Temperatures. *Theriogenology* 53 : 1477-1488.

- Correa JR, Heershe G, Zavos PM. 1996. Sperm Membrane Functional Integrity and Response of Frozen Thawed Bovine Spermatozoa During the Hypoosmotic Swelling Test Incubation at Varying Temperatures. *Theriogenology* 47 : 715-723.
- Ducha N. 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm after Storage in Cep-2 Extender with and Without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 15 : 979-985.
- Evans C, Maxwell. 1987. Salomon's Artificial Insemination of sheep and Goats. Victoria. Butter Woths Pty Ltd Collingwood. 185-194
- Garner DL, Hafez ESE. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> eds. Edited by Hafez ESE, Hafez, B. Baltimore. Lippincott & Williams. 7: 96-109.
- Hafez ESE, Hafez B. 2008. Preservation and Cryopreservation of Gamete and Embryos. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> eds. Edited by Hafez ESE, Hafez, B. Baltimore. Lippincott Williams and Wilkins 6 : 82-95.
- Kardivel G, Kumar S, Kumaresan A. 2009. Lipid Peroxidation, Mitochondrial Membran Potential and DNA Integrity of Spermatozoa in Relation to Intracellular Reactive Oxygen Species in Liquid and Frozen. *J Animal Reproduction Science* 114 : 125-134.
- Kulaksiz R, Cebi C, Akcay E, Daskin A. 2010. The Protective Effect of Egg Yolk from Different Aviant Species During the Criopreservation of Karayaka Ram Semen. *J Small Ruminant Research* 88 : 12-15.
- Moussa M, Martinez V, Trimeche A, Tanturier D, Anton M. 2002. Low Density Lipoprotein extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57 : 1591-1762.
- Pareira GR, Becker EG, Siqueira LC, Ferreira R, Severo CK, Truzzi VS, Oliveira JFC, Goncalves PBD. 2010. Assesment of Bovine Spermatozoa Viability Using Different Cooling Protocols Prior to Cryopreservation. *Italian Journal of Animal Science* 9 : 403-407.
- Pineda MH. 2003. Male Reproductive System. *In Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5<sup>th</sup> Edition. Edited by Pineda MH. and Dooley MP. Ames Blackwell Publishing. 293-341.
- Pratiwi WC, Affandhy L, Pamungkas D. 2005. Observasi Kualitas Spermatozoa Pejantan Simental dan PO dalam *Straw* Dingin Setelah Penyimpanan Selama 7 Hari pada Suhu 5°C. Cibinong. Pusat Penelitian Bioteknologi. LIPI. 200-205
- Priastomo IB, Antanto RJ, Khoirinaya C, Wardani AA. 2009 Daya Tahan Spermatozoa Sapi Frisien Holstein dalam Berbagai Pengencer pada Suhu 5°C. *Media Peternakan* 30 : 163-172.
- Putranti OD, Kustono, Ismaya. 2010. Pengaruh Penambahan *Crude Tannin* pada Sperma Cair Kambing Peranakan Ettawa Yang Disimpan Selama 14 Hari Terhadap Viabilitas Spermatozoa. *Buletin Peternakan* 34(1) : 1-7.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An Osmotic Resistance Test for Bovine Semen. *Anim Reprod Sci* 36 : 77-86.
- Said S, Gunawan M, Kaiin EM, Tappa B. 2005. Daya Tahan Sperma Cair Sapi Simental yang Disimpan dalam *Straw* pada temperatura 5°C. Pusat penelitian Bioteknologi. LIPI. *Buletin Peternakan* 16 : 58-73.
- Sankai T, Tsuchiya H, Ogoniku N. 2001. Shortterm Nonfrozen Strage of Mouse Epididymal Spermatozoa. *Theriogenology* 55 : 1759-1768.
- Sasongko WT, Yusiati LM, Bachruddin Z, Mugiono. 2010. Optimalisasi Pengikatan Tanin Duan Nangka dengan Protein Bovine Serum Albumin. *Buletin Peternakan* 34 : 154-158.
- Shannon P, Vishwanath R. 2000. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. *Animal Reproduction Science* 62 : 23-53.
- Solihati N, Idi R, Rasad SD, Rizal M, Fitrianti M. 2008. Kualitas Spermatozoa Cauda Epididimis Sapi Peranakan Ongole (PO) dalam Pengencer Susu, Tris dan Sitrat Kuning Telur pada Penyimpanan 4-5°C. *Animal Production* 10(1) : 22-29.
- Susilawati T. (2011). *Spermatology*. Malang. Universitas Brawijaya Press.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Sutama IK. 2001. Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah setelah Ekuilibrasi. *Hayati* 8 : 70-75.
- Verbercmoes, S, Van Soom, A, Dewulf, J, De Pauw, I, De Kruif, A. 2004. Storage of Fresh Bovine Semen in Diluent Based on the Ionic Composition of Cauda Epididymal Plasma. *J Reproduction in Domestic Animal*. 39:1-7.

- Verbercmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Kruit A. 2005. Comparison of Three Diluents For The Storage of Fresh Bovine Semen. *Theriogenology* 63 : 912 – 922.
- Watson PF. 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod Domest Anim* 31 : 135-140.
- White IG. 1993. Lipid and Ca Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation. *Reprod Fertil* 5 : 639-6480.
- Yitnosumarto S. 1993. *Percobaan Perancangan, Analisis, dan Interpretasinya*. Jakarta. PT Gramedia Pustaka Utama. Hal 117-202.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas dan Keutuhan Plasma Spermatozoa Epididimis Kucing Selama Penyimpanan pada suhu 4°C. *Media Kedokteran Hewan* 21(3) : 100-104.
- Yu I, Leibo SP. 2002. Recovery Motile Membrane Intact Spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*. 57 : 1179-1190.
- Yusuf TL, Arifiantini RI, Mulyadi Y. 2006. Efektifitas Waktu Pemaparan Glicerol terhadap Motilitas Spermatozoa pada Pembekuan Semen Domba Lokal Menggunakan Pengencer Tris Kuning Telur. *Animal Production* 8(3) : 168-173.
- Zhao BT, Han D, Xu CL, Luo MJ, Chang ZL, Tan JH, 2009. Protocol Optimization for Long Term Liquid Storage of Goat Semen in a Chemically Defined Extender. *J Reproduction in Domestic Animals* 44 : 865-872.