

PENGARUH HOLDING TIME TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA SEMEN CAIR BABI DALAM PENGECER KOMERSIAL

Reni Ratni Dapawole¹ dan Alexander Kaka²

¹Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Kristen Wira Wacana Sumba
Email: reniratni@gmail.com

²Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Kristen Wira Wacana Sumba
Email: alexanderkaka84@yahoo.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *holding time* (HT) dalam pengencer *Beltsville Thawing Solution* (BTS®) dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa babi. Sumber semen berasal dari tiga ekor babi jantan bangsa *Landrace* berumur 2-3 tahun, dikoleksi dua kali seminggu dengan menggunakan *glove hand method*. Semen dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis, kemudian semen dibagi menjadi tiga bagian kemudian diencerkan menggunakan pengencer BTS® dan dilakukan HT selama 0, 1 dan 3 jam. Semen yang telah mengalami HT 0, 1 dan 3 jam dibagi masing-masing ke dalam dua tabung disimpan pada suhu 18°C (kotak *styrofoam*) dan 5°C (lemari es). Pengamatan terhadap persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa dilakukan setiap tiga jam (18°C) dan setiap satu jam (5°C). Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Analisis of Variance* (ANOVA) dengan menggunakan program SPSS. Hasil penelitian menunjukkan motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan HT 0 jam lebih baik ($P < 0.05$) dibandingkan dengan HT selama 1 dan 3 jam. Kesimpulan dari penelitian ini adalah *holding time* tidak diperlukan untuk semen cair dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa babi.

Kata kunci: Semen Babi, *Holding Time*, Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa

PENDAHULUAN

Pengembangan ternak babi di beberapa daerah sudah menerapkan pemeliharaan babi unggul. Penggunaan semen cair untuk periode waktu yang relatif lebih lama memerlukan preservasi yang bertujuan untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan dalam proses fertilisasi. Disamping itu pula, penggunaan bahan pengencer dan penyimpanan semen cair pada temperatur tertentu dalam waktu yang lama akan mempengaruhi persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Semen babi berbeda dengan ternak lain, karena semen babi sangat sensitif terhadap *cold shock* yang dapat mengurangi daya tahan dan daya simpan spermatozoa. Pada saat suhu rendah terjadi perubahan struktur *phospholipid* membran plasma dari fase cair menjadi fase gel, yang dapat menyebabkan kerusakan membran plasma secara permanen. Hal ini menyebabkan membran plasma spermatozoa babi tidak stabil pada suhu rendah, sehingga semen babi hanya dapat disimpan pada suhu 15-20°C (Paulenz *et al.* 2000). Semen babi tidak dapat langsung di encerkan dan di simpan karena dapat menyebabkan terjadinya *cold shock* sehingga diperlukan waktu beberapa saat sebelum disimpan pada suhu preservasi yang dikenal dengan *holding time* (Rienprayoon *et al.* 2012 dan Eriksson 2000). Dengan dilakukannya *holding time* diduga akan mengurangi efek *cold shock*, selain itu juga diharapkan semen cair babi dapat disimpan pada suhu 5°C dengan kualitas yang sama dengan suhu 18°C. Penelitian mengenai *holding time* dilaporkan bahwa sebelum diproses spermatozoa mampu mempertahankan sperma hidup selama 6 jam (Casas and Althouse 2013).

Usaha untuk mencapai semen babi dengan dengan kualitas yang baik dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa maka semen perlu dicampurkan dengan bahan pengencer yang dapat menjamin kebutuhan fisik dan kimianya. Penggunaan

BTS® sebagai bahan pengencer sangat bermanfaat dalam preservasi spermatozoa babi. BTS® merupakan bahan pengencer tipe short-term/berdaya simpan pendek (3-4 hari), mengandung Bovine Serum Albumin (BSA) dan Glisin yang berperan untuk menjaga kelangsungan pertumbuhan dan perkembangan dari suatu sel (Bassol 2005). Berkaitan dengan hal tersebut, penelitian ini bertujuan selain untuk mengetahui seberapa besar pengaruh *holding time* dan juga untuk mengkaji penggunaan bahan pengencer BTS® pada suhu penyimpanan berbeda 18°C dan 5°C terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa babi.

METODE PENELITIAN

Penampungan semen babi dilakukan dengan metode manual (*glove hand method*) menggunakan *dummy show* pada pagi hari dengan periode dua kali dalam seminggu penampungan. Semen hasil koleksi ditampung dalam tabung penampung yang dilengkapi dengan kain kasa untuk menyaring fraksi gelatin. Bahan pengencer semen yang digunakan adalah BTS® (Beltsville Thawing Solution) dengan kandungan bahan kimia seperti dijabarkan pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Bahan Pengencer Semen Babi

Komposisi (g/L)	BTS®
Glukosa	3.7
EDTA	0.125
Natrium Sitrat	0.6
Natrium Bikarbonat	0.125
Kalium Klorida	0.075
Pennisilin (IU) : Streptomisin	100.000 :100
Aquabidest (ml)	100

(Johnson *et al.* , 2000).

Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen yang memiliki motilitas di atas 70% dengan konsentrasi di atas 200×10^6 sel/ml dengan abnormalitas di bawah 20% diproses untuk semen cair.

Semen segar diencerkan dengan pengencer BTS®. Semen yang diencerkan dibagi dalam tiga tabung dan dibiarkan pada suhu ruang 27-28°C (*holding time*) selama 0, 1 dan 3 jam diamati motilitas dan viabilitas spermatozoa. Setelah *holding time* 0, 1 dan 3 jam semen disimpan pada suhu 18°C (kotak *styrofoam*) dan 5°C (lemari es). Kualitas semen yang diuji adalah motilitas (progresif) dan viabilitas spermatozoa dilakukan setiap tiga jam untuk suhu 18°C dan setiap satu jam untuk suhu 5°C, hingga motilitas spermatozoa sampai 40%.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data penelitian dianalisis menggunakan Analisis of Variance (ANOVA), jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan sesuai petunjuk Steel dan Torrie (1995). Data diolah menggunakan program SPSS versi 15.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan semen segar babi secara makroskopis menunjukkan volume semen 242.86 ± 34.50 ml, berwarna putih-krem, dengan konsistensi encer dan pH 6.74 ± 0.11 sedangkan secara mikroskopis motilitas spermatozoa $73.57 \pm 3.78\%$, konsentrasi spermatozoa $278.57 \pm 81.33 \times 10^6$ sel/mL dengan viabilitas spermatozoa $86.91 \pm 1.89\%$ dan abnormalitas spermatozoa sebesar $7.18 \pm 0.91\%$. Secara umum, karakteristik semen segar babi yang normal menurut Robert (2006) dan AX *et al.* (2000) menyatakan volume babi tanpa gelatin berkisar 200-250 ml, warna putih krem dengan konsentrasi spermatozoa berkisar $200-300 \times 10^6$ sel/mL (Garner dan Hafez, 2000) dan konsistensi encer, persentase abnormalitas

kurang dari 20% sedangkan untuk pH rata-rata $6,7 \pm 0,1$ hasil ini lebih rendah dibandingkan Gadea (2000) yang menyatakan pH rata-rata $7,40 \pm 0,2$.

Hasil pemeriksaan mikroskopis menunjukkan motilitas spermatozoa yaitu $73.57 \pm 3.78\%$, hasil tersebut tidak jauh berbeda dari hasil penelitian Yusuf *et al* (2017) melaporkan motilitas spermatozoa berkisar antara $76.31 \pm 4.80\%$. Hasil pemeriksaan didapatkan konsentrasi spermatozoa adalah $278.57 \pm 81.33 \times 10^6$ sel/ml, hasil tersebut tidak jauh berbeda dibandingkan dengan hasil Garner dan Hafez (2000); Robert (2006) yakni berkisar antara $200-300 \times 10^6$ sel/ml. Beberapa faktor yang mempengaruhi konsentrasi spermatozoa antara lain jumlah ejakulat, interval penampungan, kondisi pejantan dan lingkungan (Johnson *et al.* 2000). Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa yang hidup di identifikasikan dengan tidak menyerap warna (transparan) pada bagian kepala spermatozoa, sedangkan spermatozoa yang yang mati di tandai dengan menyerap warna pada bagian kepala spermatozoa karena permeabilitas spermatozoa yang meningkat (Gambar 1). Rataan viabilitas spermatozoa dari penelitian ini adalah $86.91 \pm 1.89\%$, hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian Johnson *et al.* (2000) yang memperoleh viabilitas spermatozoa 80%. Persentase spermatozoa hidup lebih tinggi dari pada spermatozoa motil karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semuanya motil progresif (Kostaman dan Utama 2006).

Pemeriksaan morfologi spermatozoa abnormal penting dilakukan sebab abnormalitas yang tinggi akan mengganggu fertilitas jantan secara umum (Garner dan Hafez, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase abnormalitas mencapai 7.18 ± 0.91 . Hasil ini sesuai dengan pernyataan Johnson *et al.* (2000) yakni persentase abnormalitas babi per ejakulat tidak boleh lebih dari 20%. Secara umum, abnormalitas pada spermatozoa dapat disebabkan oleh berbagai faktor antara lain genetik, stress, suhu lingkungan, penyakit dan bahkan perlakuan kriopreservasi pada pembekuan semen (Arifiantini dan ferdian 2006).



Gambar 1. Spermatozoa hidup dan mati dengan pewarnaan eosin-nigrosin (a) spermatozoa hidup dan (b) spermatozoa mati

Waktu antara koleksi semen sampai suhu diturunkan menjadi suhu preservasi ($15-20^{\circ}\text{C}$) disebut *Holding Time*. Tujuan dilakukannya HT agar spermatozoa tidak mengalami *cold shock* ketika berada di bawah suhu preservasi $15-20^{\circ}\text{C}$. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan penurunan motilitas spermatozoa antara HT 0, 1 dan 3 jam pada suhu 18°C maupun 5°C (Tabel 2).

Pada tabel 2 menunjukkan bahwa daya tahan spermatozoa HT 0 jam pada suhu 18°C mampu mempertahankan persentase motilitas spermatozoa $45.00 \pm 3.54\%$ selama 12 jam pengamatan lebih tinggi dibandingkan dengan HT 1 jam menunjukkan motilitas spermatozoa $42.00 \pm 4.47\%$ selama 9 jam pengamatan. Sedangkan pada HT 3 jam menunjukkan motilitas spermatozoa $49.00 \pm 5.48\%$ selama 3 jam pengamatan. Hasil penelitian ini berbeda jauh dari

hasil penelitian terdahulu Casas and Althouse (2013) yang melaporkan bahwa kualitas spermatozoa babi setelah dilakukannya HT 6 jam masih dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sampai 24 jam (42.25%).

Pada suhu 5°C menunjukkan hasil yang berbeda dimana pada HT 1 jam dengan motilitas spermatozoa 40.00±0.00% selama 2 jam pengamatan, sedangkan untuk HT 1 jam dan HT 3 jam menunjukkan motilitas spermatozoa 66.00±4.18% dan 57.00±7.58% selama 0 jam pengamatan. Hasil penelitian berbeda jauh dari hasil penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa penyimpanan semen cair babi pada suhu 5°C menunjukkan motilitas spermatozoa 32.5% selama tiga hari (Dziekonska dan Strzezek 2011).

Adanya perbedaan penurunan motilitas spermatozoa antara perlakuan HT 0 jam dengan 1 dan 3 jam disebabkan karena semen tidak langsung disimpan pada suhu preservasi 18°C maupun 5°C akan tetapi masih disimpan pada suhu ruang 27-28 °C. Pada suhu ruang, spermatozoa mempunyai daya tahan hidup yang sangat pendek. Hal ini disebabkan, pada suhu ruang 27-28°C spermatozoa melakukan aktivitas seluler yang hampir optimal sehingga substrat energi di dalam plasma semen babi, terutama glukosa cepat habis dan terdapat akumulasi asam laktat sebagai sisa metabolisme dengan konsentrasi lebih tinggi yang bersifat toksik bagi spermatozoa. Menurut Vishwanath dan Shannon (2000) menyatakan bahwa sumber utama peroksidasi yang terjadi pada suhu ruang adalah oksidatif deaminase dari asam amino aromatik oleh enzim aromatic amino acid aminase (AAAO). Semakin tinggi suhu penyimpanan dan semakin lama HT menyebabkan jumlah enzim ini akan meningkat. Enzim AAAO ini tidak aktif pada spermatozoa yang masih hidup. Selain itu, penurunan motilitas spermatozoa juga dapat terjadi sebagai akibat penurunan suhu yang rendah yang menyebabkan terjadinya perubahan *phospholipid* sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan membran plasma secara permanen akibat *cold shock*.

Tabel 2. Pengaruh Holding Time terhadap Motilitas Spermatozoa Semen Cair

Waktu Pengamatan (jam)	Holding Time (jam)		
	0	1	3
	<i>Suhu 18°C</i>		
0	72.00±2.74 ^a	66.00±4.18 ^a	57.00±7.58 ^b
3	66.00±2.24 ^a	59.00±2.24 ^b	49.00±5.48 ^c
6	61.00±2.24 ^a	51.00±2.24 ^b	39.00±5.48 ^c
9	55.00±3.54 ^a	42.00±4.47 ^b	31.00±7.42 ^c
12	45.00±3.54 ^a	33.00±4.47 ^b	22.00±8.37 ^c
15	38.00±2.74 ^a	23.00±4.47 ^b	13.00±6.71 ^c
	<i>Suhu 5°C</i>		
0	72.00±2.74 ^a	66.00±4.18 ^a	57.00±7.58 ^b
1	56.00±4.18 ^a	37.00±4.47 ^b	23.00±9.08 ^c
2	40.00±0.00 ^a	20.00±9.35 ^b	13.00±5.70 ^b
3	32.00±2.74 ^a	19.00±6.52 ^b	7.60±3.36 ^c

Keterangan: Huruf superscrip a, b pada baris yang sama menunjukkan angka pada baris tersebut berbeda nyata dengan tingkat signifikan 5%

Viabilitas spermatozoa dengan perlakuan HT 0, 1 dan 3 jam pada suhu penyimpanan 18°C maupun 5°C masih menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa yang tinggi dibandingkan dengan motilitas spermatozoa. HT pada suhu 18°C selama 15 jam pengamatan HT 0, 1 dan 3 jam menunjukkan viabilitas spermatozoa masing-masing sebesar 72.66±1.67%, 69.76±4.22% dan 56.04±3.36%. Sedangkan pada suhu 5°C selama tiga jam pengamatan menunjukkan viabilitas spermatozoa masing-masing perlakuan adalah 72.73±1.65%, 65.82±3.38% dan 58.97±1.64%.

Penyimpanan semen cair pada suhu 5°C akan merangsang perubahan membran plasma dari fase cair ke fase gel. Pada suhu ruang (27-28°C) metabolise terjadi hampir optimal. Setiap penurunan suhu 10°C, metabolisme akan menurun sampai 50% sehingga pada 5°C metabolisme hanya terjadi 10% saja (McKinnon 1999). Prinsip penekanan metabolisme dalam preservasi ini masih memungkinkan spermatozoa tetap melakukan aktivitas seluler. Oleh karena itu spermatozoa memerlukan energi untuk proses metabolisme.

Tabel 3. Pengaruh Holding Time terhadap Viabilitas Spermatozoa Semen Cair

Waktu Pengamatan (jam)	Holding Time (jam)		
	0	1	3
<i>Suhu 18°C</i>			
0	85.28±1.81 ^a	83.03±0.85 ^a	72.66±2.37 ^b
3	82.63±1.96 ^a	79.59±2.43 ^a	70.95±3.24 ^b
6	80.73±2.26 ^a	77.27±2.91 ^a	64.32±4.16 ^b
9	77.94±0.88 ^a	76.01±2.00 ^a	61.48±4.51 ^b
12	76.28±0.89 ^a	72.19±3.73 ^a	58.63±3.87 ^b
15	72.66±1.67 ^a	69.76±4.22 ^a	56.04±3.36 ^b
<i>Suhu 5°C</i>			
0	85.28±1.81 ^a	83.03±0.85 ^a	72.66±2.37 ^b
1	79.78±1.32 ^a	75.66±3.21 ^b	70.23±1.96 ^c
2	77.02±1.32 ^a	70.61±2.99 ^b	64.67±3.60 ^c
3	72.73±1.65 ^a	65.82±3.38 ^b	58.97±1.64 ^c

Keterangan Huruf superscrip a, b pada baris yang sama menunjukkan angka pada baris tersebut berbeda nyata dengan tingkat signifikan 5%

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa *holding time* tidak diperlukan untuk semen cair dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa babi selama penyimpanan semen cair .

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada UPTD Peternakan Tarus dan Yayasan Williams dan Laura di Kupang yang telah memfasilitasi penelitian ini.

REFERENSI

- Arifiantini RI, Ferdian F. 2006. Tinjauan Aspek Morfologi dan Morfometri Spermatozoa Kerbau Rawa (*Bubalus bubalis*) yang Dikoleksi dengan Teknik Mesase. *Jurnal Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Udayana* 7 : 83-91.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Semen Evaluation. In: Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. p 365-389.
- Bassol J, Kadar E, Briz MD, Pinart E, Sancho S, Garcia-Gil N, Badia E, Pruneda A, Coll MG, Bussalleu E, Yaste M, Bonet S. 2005. *In vitro* culture of boar epididymal epithelial cells. *Theriogenolog* 63: 363-369.
- Casas I and Althous GC. 2013. The protective effect of a 17 oC holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure 5 oC. *Cryobiology* 66: 69-75.

- Dziekonska A, Strzezek J. 2011. Boar Viability affects Sperm Metabolism Activity In Liquid Stored Semen At 5oC. *Polis J of Vet. Sciences* Vol 14, No. 1: 21-27.
- Eriksson B. 2000. Cryopresevation of Boar Semen. *Studies on Sperm Viability in Vitro and Fertility*. Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- Gadea J. 2003. Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish journal of Agricultural Research* 1 (2): 17-27.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez E. S. E. and B. Hafez (Eds.). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. US: Lippincott Williams & Wilkins. pp 96-109.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, and Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *J Anim sci* 62: 143-172.
- Kostaman T, Sutama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing Boer pada pengencer tris sitrat-fruktosa. *J Sain Vet*. 24(1):58-64.
- McKinnon AO. 1999. Breeding and its technology—now and the future. www.Harness.org.au/99wldcon/CONFEREN/HTM (4 Juli 2006).
- Paulenz H, Kommsrud E, and Hofmo PO. 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 35 : 58 – 85.
- Rienprayoon C, Klangnak C, Onton S, Tretipskul C, and Tummaruk P, 2012. A comparative study on the efficacy of four commercial semen extenders used during the holding time on the qualities of frozen-thawed boar semen. *Thai J. Vet. Med.* 42, 195-200.
- Robert VK. 2006. Semen processing. *Extending & Storage for Artificial Insemination in Swine*. Dep. Of Animal Science Universty of Illinois.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistik: Suatu Pendekatan Biometrik*. Sumantri B, penerjemah. Jakarta (ID): Gramedia Pustaka Utama. Terjmahan dari: *Prinsiples ans Prosedures of Statistik: A Biometrical Approach*. 772 hlm.
- Viswanath R and Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim Repr Sci* 62 : 23-53.
- Yusuf TL, Arifiantini RI, Dapawole RR, Nalley WMM. 2017. Kualitas semen Beku Babi Dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi Dengan Trehalosa. *Jurnal veteriner*. Udayana. Vol. 18 No. 1 : 69-75.