



KARAKTERISTIK KINEMATIK SPERMA SEMEN BEKU SAPI ACEH DALAM DUA PENGENCER

Edy Sophian^{1,2*}, Andi Widodo², Iman Sukirman³, Syahrudin Said⁴, Muhammad Agus Setiadi⁵ dan Raden Iis Arifiantini⁵

¹Program Studi Ilmu Biomedis Hewan peminatan Biologi Reproduksi,, Sekolah Pascasarjana IPB University

²Pusat Riset Zoologi Terapan Organisasi Riset BRIN

³Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang Jawa Timur

⁴Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Bandung Jawa Barat

⁵Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University

*email: edy_sophianedy@apps.ipb.ac.id

Abstrak. Penggunaan pengencer dalam produksi semen beku dapat memengaruhi pola gerak (kinematik) sperma. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakteristik kinematik sperma semen beku sapi Aceh dalam dua jenis pengencer yang berbeda. Sampel semen beku diperoleh dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari dan Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang. Sampel semen beku dari lima ekor sapi Aceh jantan, dua ekor menggunakan pengencer Tris Kuning Telur (TKT) dan tiga ekor menggunakan pengencer skim kuning telur (SKT) masing-masing 5 *batch* produksi dan 10 straw per *batch*. Semen beku di-*thawin* dalam suhu 37°C selama 30 detik. Semen dikeluarkan dari straw dan disimpan dalam tabung mikro dan diletakkan pada dry bath (37°C). Semen yang telah dethawing diambil sebanyak 10 µl dan diencerkan dengan 50 µl Phosphate Buffer Saline (PBS), kemudian dihomogenkan dan diambil sebanyak 4 µL diletakkan di atas gelas objek, ditutup dengan gelas penutup. Sampel dievaluasi menggunakan *computer assisted semen analysis* (CASA; Sperm Vision, Minitube Germany). Kinematik sperma yang diuji adalah VAP (µm/s), VCL (µm/s), VSL (µm/s), STR (%), LIN (%), WOB (%), ALH (µm), BCF (Hz)DAP (µm/s), DCL (µm/s), DSL (µm/s). Hasil menunjukkan jarak tempuh sperma (DAP, DCL, DSL), dan kecepatan pergerakan sperma (VAP, VCL, VSL) signifikan ($p < 0,05$) lebih tinggi pada semen beku dalam pengencer TKT dibandingkan dengan pengencer SKT. Parameter kinematik sperma yang lain (STR, LIN, WOB, ALH, dan BCF) tidak menunjukkan perbedaan. Penelitian menyimpulkan sperma semen beku dalam pengencer TKT menunjukkan nilai kinematik lebih tinggi pada beberapa variabel dibandingkan dengan pengencer SKT.

Kata kunci: CASA, kinematik, pengencer, sapi aceh, semen beku.

Abstract. Semen diluent affects the movement pattern (kinematics) of sperm. The aim of this study is to compare the kinematic properties of frozen semen from Aceh cattle in two different types of diluents. Frozen semen samples were obtained from the Artificial Insemination Center in Singosari and the Artificial Insemination Center in Lembang. Frozen semen samples from five Aceh bulls, two using egg yolk tris diluent (TKT) and three using egg yolk skim milk diluent (SKT) with 5 production batches each and 10 straws per batch. Frozen semen was thawed at 37°C for 30 seconds. Semen was removed from the straw, stored in microtubes and placed in a dry bath (37°C). Thawed semen was collected in a volume of 10 µl and diluted with 50 µl of phosphate buffer solution (PBS), then homogenized and transferred in a volume of 4 µl to a slide covered with a coverslip. The samples were analysed using computer-assisted sperm analysis (CASA; Sperm Vision, Minitube Germany). The results showed that sperm movement distance (DAP, DCL, DSL) and sperm movement velocity (VAP, VCL, VSL) were significantly ($p < 0.05$) higher in semen frozen in TKT diluent compared to SKT diluent. Other sperm kinematic parameters (STR, LIN, WOB, ALH and BCF) showed no difference. ALH values were 4.44 and 5.01 µm, less than 7 µm indicating sperm hyperactivation. The study concluded that sperm frozen in TKT dilution showed higher kinematic values for several variables than in SKT dilution and no evidence of hyperactivation.

Keyword: CASA, sperm kinematic, diluent, Aceh cattle, frozen semen



PENDAHULUAN

Kinematik sperma adalah pola gerak sperma yang dapat dievaluasi dengan *computer assisted semen analysis* (CASA). *Computer assisted semen analysis* akan menangkap urutan gambar dari setiap sel sperma, kemudian, sistem akan menggunakan algoritma untuk melacak lintasan sel, sehingga menggambarkan pergerakannya (Amann dan Waberski 2014). Kinematik sperma dari hasil evaluasi menggunakan CASA antara lain *total motility*, *progressive motility velocity average path* (VAP); *velocity curvilinear* (VCL); *velocity straight line* (VSL); *distance average path* (DAP); *distance curve linear* (DCL); *distance straight line* (DSL); *straightness* (STR); *linearity* (LIN); *wobble* (WOB); *amplitude of lateral head* (ALH) dan *beat cross frequency* (BCF).

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa teknik evaluasi motilitas sperma menggunakan mikroskop biasa tidak akurat dan tidak tepat dalam memprediksi fertilitas sperma (Broekhuijse *et al.* 2011). Balai Inseminasi Buatan (BIB) di Indonesia sebagian telah memiliki CASA sehingga penilaian semen lebih objektif. Indikator dari kinematik sperma beberapa berhubungan dengan kemampuan sperma dalam membuahi sel telur (Broekhuijse *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2013; Nagy *et al.* 2015). Korelasi antara fertilitas sapi jantan dan parameter kecepatan sel sperma telah dilaporkan oleh Nagy *et al.* (2015). Hasilnya menunjukkan terdapat korelasi yang erat dengan signifikansi yang tinggi untuk masing-masing kecepatan sperma (VCL, VSL, VAP) dan terbukti untuk indikator *non-return rate* pada hari ke 30 dan *pregnancy rate* hari ke 75.

Beberapa faktor eksternal dapat memengaruhi penilaian motilitas dan kinematik sperma, antara lain suhu saat mengevaluasi semen (Viquez *et al.* 2021). Oleh karena itu mikroskop harus dilengkapi *heating table*. Faktor lain yang memengaruhi kinematik sperma adalah bahan pengenceran yang digunakan (Buyukleblebici *et al.* 2014). Kekentalan bahan pengencer semen akan memengaruhi kinematik sperma terutama dalam beberapa variabel kecepatan sperma bergerak seperti VCL, VSL, VAP. Bahan pengencer untuk pembekuan semen sapi terdapat beberapa macam, antara lain pengencer skim kuning telur (Arif *et al.* 2021), Tris kuning telur (Baharun *et al.* 2017) dan pengencer komersial (Amal *et al.* 2019; Tahar *et al.* 2022). Bahan-bahan pengencer tersebut mempunyai kekentalan/ viskositas yang berbeda, bergantung bahan yang terkandung didalamnya.

Bahan pengencer semen harus mengandung buffer, anti *cold-shock* dan antibiotik. Pengencer susu skim biasanya tetap ditambahkan kuning telur ke dalamnya, meskipun dalam jumlah yang kecil. Tris kuning telur (TKT) memiliki kandungan yang relatif lengkap seperti Tris (hydroxymethyl aminometan), asam sitrat, dan fruktosa. Fruktosa merupakan gula sederhana sebagai sumber karbohidrat untuk energi dalam menjalankan fungsi fisiologik sel (Naing *et al.* 2010). Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan karakteristik kinematik sperma semen beku dari sapi aceh dalam dia pengencer berbeda.



METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan September 2023 di Laboratorium Karakterisasi Sel Hewan, Gedung Genomik, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Bogor, di Laboratorium produksi Balai BIB Lembang Bandung Jawa Barat dan di Balai BIB Singosari, Malang Jawa Timur. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Hewan BRIN. (Nomor: 094/KE.02/SK/05/2023).

Koleksi Semen Beku

Semen beku dari pejantan sapi Aceh diperoleh dari BIB Lembang yang menggunakan pengencer susu skim (3 ekor) dan BBIB Singosari yang menggunakan tris kuning telur (2 ekor). Sample semen beku masing-masing diambil 5 *batch* produksi per ekor dan 10 straw per *batch*.

Thawing

Straw satu persatu di-*thawing* menggunakan *water bath* suhu 37°C selama 30 detik, kemudian dimasukkan ke dalam mikrotub dan disimpan pada suhu 37°C.

Pengujian Kinematik sperma

Kinematik sperma yaitu motilitas total (%), motilitas progresif (%), DAP ($\mu\text{m/s}$), DCL ($\mu\text{m/s}$), DSL ($\mu\text{m/s}$), VAP ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), STR (%), LIN (%), WOB (%), ALH (μm), BCF (Hz) diamati secara objektif menggunakan CASA (Oliveira *et al.* 2013). Semen yang telah di-*thawing* sebanyak 10 μl diencerkan dengan 50 μl *Phosphate Buffer Saline* (PBS), kemudian dihomogenkan. Sebanyak 4 μl dari larutan tersebut diletakkan di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup. Preparat selanjutnya diamati menggunakan CASA (SpermvisionTM 3.7.8, Minitube, Germany) dilengkapi *warmer stage* suhu 37°C. Kinematik sperma diamati sebanyak 4 lapang pandang, sekitar 1000 sperma dikalkulasi untuk setiap variabel (Maulana *et al.*, 2021).

Analisis data

Normalitas data penelitian diuji menggunakan uji Shapiro dan Wilk, serta homogenitas data menggunakan uji Levene. Data selanjutnya diuji menggunakan uji T dengan bantuan *soft ware* Minitab 18.1 (Minitab, Inc. USA).

Tabel 1. Deskripsi kinematik sperma oleh CASA

Parameter	Uraian
DCL(<i>distance curve linear</i> ; $\mu\text{m}/\text{detik}$)	jarak yang dapat ditempuh oleh sperma dalam satu menit pada lintasan curva.
DSL (<i>distance straight line</i> ; $\mu\text{m}/\text{detik}$)	jarak yang dapat ditempuh oleh sperma dalam satu menit pada lintasan lurus
DAP (<i>distance average path</i> ; $\mu\text{m}/\text{detik}$)	jarak yang dapat ditempuh oleh sperma dalam satu menit pada lintasan rata-rata alur
VCL(<i>velocity curvilinear</i> $\mu\text{m}/\text{detik}$)	kecepatan pergerakan sperma pada jalur melengkung
VSL (<i>velocity straight line</i> $\mu\text{m}/\text{detik}$)	kecepatan pergerakan sperma pada jalur lurus
VAP (<i>velocity average path</i> $\mu\text{m}/\text{detik}$)	kecepatan rata-rata sperma, yang dihitung dengan membagi panjang alur dengan waktu tempuhnya
LIN (<i>linearity</i> %)	kelurusan jalur kurva linier. Nilai LIN diperoleh dengan membagi $VSL/VCL \times 100$
STR (<i>straightness</i> %)	kelurusan rata-rata jalur spasial. Nilai STR diperoleh dengan $VSL/VAP \times 100$.
WOB (<i>wobble</i> %)	pengukuran osilasi lintasan aktual. Nilai WOB diperoleh dengan $VAP/VCL \times 100$.
ALH (<i>amplitude of lateral head</i> μm)	lebar osilasi kepala saat sperma bergerak
BCF (<i>beat cross frequency</i> Hz)	frekuensi di mana kepala sperma bergerak di lintasan mereka melintasi jalan mereka.

(Santoso et al 2023)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kinematik sperma semen beku setelah thawing pada sapi Aceh menggunakan dua pengencer berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.

Penelitian ini menunjukkan variabel kinematik sperma khususnya pada motilitas progresif, jarak tempuh sperma (DAP, DCL, DSL), dan kecepatan pergerakan sperma (VAP, VCL, VSL) signifikan ($p < 0,05$) lebih tinggi pada sperma semen beku dalam pengencer TKT dibandingkan dengan pengencer SKT. Variabel kinematik sperma yang lain (STR, LIN, WOB, ALH, dan BCF) tidak menunjukkan perbedaan (Tabel 2).

Motilitas sperma progresif merupakan sifat yang sangat penting dan berkaitan dengan kemampuan fertilitas, dan menjadi salah satu control kualitas dalam menentukan dosis inseminasi sebelum dan sesudah thawing (Puglisi *et al.* 2012). Motilitas sperma progresif juga berkorelasi positif dengan kemampuan fertilitas pejantan (Gebreyesus *et al.* 2021). Motilitas sperma total pada penelitian ini tidak berbeda ($p > 0,05$), namun motilitas sperma progresif dalam pengencer TKT lebih tinggi dibandingkan dengan sperma dalam pengencer SKT. Pengencer TKT meskipun menunjukkan motilitas progresif yang lebih tinggi, namun keduanya masih sesuai dengan persyaratan mutu semen beku dalam SNI semen beku yaitu $> 40\%$.

Kinematik sperma khususnya pada jarak tempuh dan kecepatan pergerakan sperma menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan sperma dalam pengencer SKT lebih lambat

dibandingkan dengan dalam pengencer TKT. Lambatnya kecepatan pergerakan sperma dalam pengencer semen SKT disebabkan pengencer SKT mengandung kuning telur dan susu, sehingga memiliki partikel lebih besar dan media menjadi lebih kental dibanding dengan TKT. Pengencer TKT meskipun mengandung kuning telur, di dalamnya terdapat tris hidroxymethyl amino methane dan asam sitrat yang juga berkerja memperkecil partikel kuning telur.

Tabel 2. Kinematika semen beku sapi Aceh dengan pengencer berbeda

Variabel	Perlakuan		Signifikansi
	PTKT	PSKT	
Motilitas (%)	58,41±3,67	60,73±3,34	TS
Progresif (%)	53,93±3,52	48,88±5,93	0,024
DAP (µm/s)	34,79±3,92	30,74±3,13	0,009
DCL (µm/s)	52,73±7,36	45,04±4,96	0,005
DSL (µm/s)	20,58±0,96	22,82±3,19	0,043
VAP (µm/s)	78,24±8,34	70,77±6,6	0,02
VCL (µm/s)	118,2±15,32	103,42±10,26	0,008
VSL (µm/s)	46,51±1,99	52,51±6,58	0,011
STR (%)	0,59±0,06	0,74±0,04	TS
LIN (%)	0,39±0,05	0,503±0,04	TS
WOB (%)	0,66±0,03	0,68±0,03	TS
ALH (µm)	4,44±0,78	5,01±0,79	TS
BCF (Hz)	26,01±1,28	27,48±2,69	TS

Keterangan: TS : tidak signifikan

Nilai kinematik sperma VCL, VAP, dan VSL dalam TKT dan SKT menunjukkan kemampuan penetrasi sperma pada sel telur yang baik. Nilai VCL (22,51 – 79,5 µm/s); VSL (11,35– 35,71 µm/s) dan VAP (12,67 – 34,45 µm/s) dihubungkan untuk sapi jantan dengan kesuburan yang rendah (Cseh *et al.* 2004). Nilai VCL dalam penelitian ini adalah 103,42 -118,2 µm/s. Nilai VAP 70,77 sampai 78,24 µm/s dan VSL 46,51 sampai 52,52 µm/s. Variabel ALH sering dihubungkan dengan gerakan yang hiperaktif. Nilai ALH yang lebih dari 7 µm mengindikasikan sperma hiperaktif (Kathiravan *et al.* 2011). Hasil penelitian ini menunjukkan nilai ALH 4,44 sampai 5,01 µm/s, sehingga dapat dikatakan sperma dalam kedua pengencer tidak mengalami hiperaktivasi.

KESIMPULAN DAN SARAN

Beberapa variabel kinematik sperma dari semen beku sapi aceh dalam dengan pengencer Tris Kuning Telur (TKT) lebih tinggi dibandingkan dengan Skim Kuning Telur). Semua variable kinematik menunjukkan nilai sperma dari kedua pengencer mampu memfertilisasi ovum dan tidak mengalami hiperaktivasi.



UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Deputi Bidang Sumber Daya Manusia Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Badan Riset dan Inovasi Nasional Direktur Manajemen Talenta dan Kepala Organisasi Riset Hayati Dan Lingkungan, Kepala Pusat Riset Zoologi Terapan BRIN, yang telah memberi kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini, terima kasih juga untuk Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang Jawa Timur dan Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Bandung Jawa Barat atas terlaksananya penelitian ini dan kerjasamanya.

REFERENSI

- Amal AS, RI Arifiantini, MA Setiadi dan S Said. 2019. Characteristics of the post-thawed Balinese bull semen extended in three different extenders and equilibration times, *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 44(2):135-145.
- Amann, R dan D Waberski. 2014. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA): Capabilities and Potential Developments. *Theriogenology* 81: 5–17.e3.
- Arif AA, T Maulana, EM Kaiin, B Purwantara, RI Arifiantini dan E Memili. 2020 Comparative analysis of various step-dilution techniques on the quality of frozen Limousin bull semen, *Veterinary World*, 13(11): 2422-2428.
- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. 2021. SNI (Standar Nasional Indonesia) Semen Beku - Bagian 1: Sapi SNI 4869.1-2021. Jakarta (ID): Badan Standardisasi Nasional.
- Baharun A, R I Arifiantini, dan TL Yusuf. 2017. Freezing Capability Of Pasundan Bull Sperm Using Tris Egg Yolk, Tris-Soy, And Andromed Diluents, *Jurnal Kedokteran Hewan March 2017*, 11(1):45-49.
- Broekhuijse MLWJ, H Feitsma, dan BM Gadella. 2011. Field Data Analysis of Boar Semen Quality, *Reproduction in Domestic Animals* 46, (2) 59–63.
- Buyukleblebici S, PB Tuncer, MN Bucak, U Tasdemir, A Eken, O Buyukleblebici, E Durmaz, S Sariozkan dan BU Endirlik. 2014. Comparing ethylene glycol with glycerol and with or without dithiothreitol and sucrose for cryopreservation of bull semen in egg-yolk containing extenders. *Cryobiology*. 69: 74-78.
- Fernandes M, P Rodríguez-Hernández, J Simões dan JP Barbas. 2021. Effects of Three Semen Extenders, Breeding Season Month and Freezing–Thawing Cycle on Spermatozoa Preservation of Portuguese Merino Sheep. *Animals* 11 : 2619.
- Gebreyesus G, MS Lund, K Kupisiewicz dan G Su. 2021. Genetic parameters of semen quality traits and genetic correlations with service sire nonreturn rate in Nordic Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 104, 10010-10019.
- Kathiravan P, J Kalatharan, G Karthikeya, K Rengarajan dan G Kadirvel. 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System– A Review *Reproduction in Domestic Animals* 46, 165–172.
- Maulana T, F Afiati, M Gunawan dan EM Kaiin. 2021. Kinematics motility of friesian-holstein sperm sexing in l-ascorbic acid treatments *Earth and Environmental Science* 762 012081 IOP Publishing .
- Nagy A, T Polichronopoulos, A Gáspárdy, L Solti, dan S Cseh. 2015. Correlation between Bull Fertility and Sperm Cell Velocity Parameters Generated by Computer-Assisted Semen Analysis. *Acta Veterinaria Hungarica*. 63. 370-381.
- Naing., SW, H Wahid, KM Azam, Y Rosnina, AB Zuki, S Kazhala, MM Bukara, M Thein, T Kyaw, dan MM San. 2010. Effect of Sugars on Characteristics of Boer Goat Semen After Cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 122(12): 23-28.
- Pfeifer LFM, JSO Junior dan JR Poteins. 2019. Effect of Sperm Kinematics and Size of Follicle at Ovulation on Pregnancy Rate after Timed AI of Beef Cows. *Animal Reproduction Science*. 201: 55-62.
- Puglisi R, A Pozzi, L Foglio, M Spano, P Eleuteri, MG Grollino, G Bongioni dan A Galli. 2012. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro hetero-spermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. *Animal Reproduction Science* 132, 17-28.
- Simonik O, J Sichtar, A Krejcarkova, R Rajmon, L Stadnik, J Beran, M Dolezalova dan Z Biniova. 2014. In Computer assisted sperm analysis – the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences* 85 (1): 3–11.



- Santoso, PI Sitaresmi, DA Mahari, RI Anwar, FB Lupitasaria, Herdis, RI Arifiantini. 2023. Sperm kinematic characteristics of pasundan bulls during frozen semen processing, International Conference on Animal Production for Food Sustainability 2023. Earth and Environmental Science 1341 (2024) 012005.
- Viquez L, V Barquero, A Valverde. 2021. Condiciones Óptimas de Análisis Cinético En Semen Fresco de Toros Brahman. Agron. Mesoam. 32, 920–938.