

PENGARUH MEDIA PENGECER DAN PLASMA SEMEN SAPI TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU KERBAU (*Bubalus bubalis*)

Diana Andrianita Kusumaningrum* dan Riasari Gail Sianturi

Balai Penelitian Ternak,
Jl Veteran 3, Kelurahan Banjarwaru-Ciawi, Bogor
*Corresponding Author Email: da_kusumaningrum@yahoo.com

Abstrak. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh media pengencer dan penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi. Penelitian dilakukan dalam rancangan pola faktorial 2x3, faktor pertama adalah pengencer (andromed vs laktosa) dan plasma semen sapi (0, 50 dan 100%). Dua ekor sapi FH digunakan sebagai sumber plasma semen, plasma semen sapi diperoleh dengan jalan melakukan sentrifuse (3000 rpm, 10 menit), supernatan diambil untuk menggantikan plasma semen kerbau (0, 50 dan 100%). Dua ekor kerbau rawa (*Bubalis bubalus*) digunakan sebagai sumber semen. Semen kerbau di sentrifuse (3000 rpm, 10 menit), supernatan diambil (0, 50 dan 100%) digantikan dengan plasma semen sapi. Konsentrasi sperma dihitung dan diencarkan menggunakan dua macam pengencer semen untuk mendapatkan konsentrasi sebesar $100 \times 10^6/\text{ml}$ dan dibekukan menurut protokol yang sudah baku dikerjakan di Balitnak. Hasil penelitian menunjukkan motilitas spermatozoa pascathawing pada medium andromed ($P < 0.05$) lebih tinggi ($27,5 + 2,5$ vs $6,0 + 1,0$) dibanding laktosa. Persentase hidup saat thawing pada andromed tidak berbeda dengan laktosa ($44,2\%$ vs $44,6\%$), sejalan dengan kondisi MPU ($74,5\%$ vs $67,3\%$). Media pengencer juga tidak menghasilkan perbedaan yang nyata pada membran tudung akrosom (TAU) sebesar $48,8$ vs $48,3\%$ untuk laktosa dan andromed. Penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi tidak menghasilkan perbedaan yang nyata baik pada persentase motilitas, spermatozoa hidup, MPU dan TAU. Tidak dijumpai adanya interaksi antara jenis media dengan penggantian plasma semen. Dapat disimpulkan penggunaan Andromed dapat memperbaiki motilitas pascathawing. Penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi tidak memperbaiki kualitas semen beku kerbau.

Kata Kunci: Plasma semen, Sapi, Kerbau, Laktose, Andomed

Abstract. The study was conducted to determine the effect of dilution media and replacement of plasma seminal of buffalo with bovine plasma seminal. The study was conducted in 2x3 factorial design, the first factor is diluents (andromed vs lactose) and second factor is bovine plasma seminal (0,50 and 100%). Two FH cow bull were used as a source of seminal plasma. Bovine Seminal plasma was obtained by centrifuging the semen at 3000 rpm, for 10 min. Two bull of swamp buffaloes (*Bubalis bubalus*) are used as a source of spermatozoa. Buffalo plasma seminal were separated from spermatozoa using centrifugation at 3000 rpm, 10 min, the supernatant taken then replaced with bovine plasma seminal (0, 50, 100%). Sperm concentration was calculated and diluted using two kinds of extender (Lactose and andromed) to obtain final concentrations of $100 \times 10^6/\text{ml}$. The preparation of frozen semen were done according protocols of Balitnak. The results showed that post-thawing motility of sperm on andromed medium was higher ($P < 0.05$) than lactose (27.6 vs 6.6). The percentage of life sperm (%H) of andromed was not different with lactose (41.6% vs 43.6%), in line with Intac Apical Ridge (TAU) conditions ($44,7\%$ vs 48.8%) for andromed and lactose, respectively. The replacement of buffalo plasma seminal with bovine plasma seminal in any levels did not significantly differences in percentage of motility, %H and %TAU. There was no interaction between media and seminal plasma replacement. It can be concluded that the use of AndroMed can improve post-thawing motility. The replacement of plasma seminal of buffalo with bovine plasma seminal did not improve the quality of buffalo frozen semen.

Keywords: Plasma seminal, bovine, Buffalo, Laktose, Andomed

PENDAHULIAN

Keberhasilan inseminasi buatan (IB) sangat tergantung pada berbagai aspek, baik aspek ternak betina (kesehatan reproduksi dan kualitas sel telur), ternak jantan (kualitas spermatozoa yang di IB) dan aspek manusia (keterampilan inseminator, ketepatan deteksi berahi dan waktu inseminasi). Keberhasilan IB pada kerbau telah dilaporkan lebih rendah dibandingkan sapi, dan salah satu faktornya adalah karena kualitas semen beku kerbau yang secara umum lebih rendah dibandingkan dengan sapi. Hal ini disebabkan karena lebih mudah terjadi kerusakan selama proses pembekuan (Goyal *et al.* 1996; Anrabi 2009).

Seminal plasma baik pada sapi maupun pada kerbau diketahui dapat menurunkan persentase motilitas, *liveability* maupun indeks *liveability* spermatozoa (Ahmad *et al.* 1994). Plasma semen kerbau diketahui mengandung *inhibitory factor* yang lebih tinggi dibanding seminal plasma sapi (Sahni dan Mohan 1990). Hal tersebut terjadi karena tingginya konsentrasi kalsium, fosfat teresterifikasi, dan berbagai enzim pemecah fosfat dalam plasma darah (Cockril 1974). Bhattacharya (1974) juga menyatakan bahwa protein plasma semen kerbau lebih rendah dibandingkan sapi (485 vs 756 mg/100 ml) sementara kandungan NPN (Non Nitrogen Protein) lebih tinggi (109 vs 48 mg/100 ml). Kandungan protein dalam seminal plasma juga lebih rendah dibandingkan sapi yang mempunyai tendensi menjadi penyebab kerusakan membran plasma akibat pembekuan lebih tinggi mencapai 55,05% (Goyal *et al.* 1996; Asadpout *et al.* 2007; Anrabi 2009). Beberapa penelitian pembekuan semen ejakulat maupun asal epididimis kerbau telah dilakukan dengan penggantian plasma semen sapi (Lodhi *et al.* 1998, Amien *et al.* 1999, Herold 2004) dengan hasil yang masih bervariasi dari cenderung lebih baik sampai sangat nyata memperbaiki viabilitas spermatozoa ejakulat, namun respon negatif pada pembekuan spermatozoa epididimis.

Untuk mendapatkan konsentrasi spermatozoa yang efisien pada Inseminasi dan untuk melindungi spermatozoa selama proses pembekuan spermatozoa maka dilakukan pengenceran menggunakan media pengencer spermatozoa. Beberapa media yang umum digunakan dalam pembekuan spermatozoa ruminansia adalah media laktose-kuning telur, tris-kuning telur, tris-sitrat-kuning telur, skim-kuning telur. Media komersial berbasis soya lechitin seperti AndroMed®, Bioxcell® and Triladyl® () berkembang dengan adanya issue *animal contamination* asal produk hewani. Andromed sebagai produk komersial merupakan pengencer siap pakai yang lengkap mengandung telah mengandung antibiotik 200 ml /1000 ml.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui bagaimana pengaruh penggunaan penggunaan media pengencer (androMed dan Laktosa) serta penggantian plasma semen terhadap kualitas semen beku kerbau.

METODE PENELITIAN

Penampungan semen

Dua ekor kerbau rawa jantan berumur 4-5 tahun, digunakan sebagai sumber semen yang ditampung dua kali seminggu menggunakan vagina buatan. Segera setelah dilakukan penampungan semen kerbau dibawa ke laboratorium untuk di periksa kualitas baik makroskopis maupun mikroskopis yang meliputi, volume, warna, konsistensi, gerakan massa, konsentrasi, persentase spermatozoa hidup (%H), tudung akrosom utuh (%TAU) dan membran plasma utuh (%MPU). Hanya semen kerbau yang normal dan layak kualitasnya dipakai dalam penelitian ini.

Dua ekor sapi perah jantan digunakan sebagai sumber plasma semen. Semen sapi dikoleksi dua kali seminggu menggunakan vagina buatan. Semen dibawa ke Laboratorium dan di sentrifus (3000 rpm 10 menit) untuk memisahkan plasma (supernatan) dari spermatozoa (pelet). Supernatan diambil dan digunakan untuk menggantikan plasma semen sapi (0, 50 dan 100%)

Pengenceran, Pembekuan dan Thawing

Semen kerbau dibagi menjadi 3 bagian dan disentrifuse (3000 rpm, 10 menit) selanjutnya supernatan dipisahkan sesuai dengan perlakuan penggantian plasma semen kerbau yaitu 0% (BS0), 50% (BS50) dan 100% (BS100). Untuk perlakuan kontrol BS-0 endapan spermatozoa yang terbentuk dari semen kerbau yang di sentrifus dicampur kembali dengan plasmanya. Pada perlakuan penambahan BS-50 sebanyak 50% seminal plasma kerbau diganti dengan seminal plasma sapi dengan volume yang sama. Sedangkan pada perlakuan penambahan BS-100, seluruh seminal plasma kerbau dibuang dan ditambahkan seminal plasma sapi sebanyak volume seminal kerbau yang telah dibuang.

Tabel 1. Komposisi pengencer semen kerbau untuk proses pembekuan

Bahan / Media	Andromed		Laktosa	
	Larutan A	Larutan B	Larutan A	Larutan B
Larutan Laktosa (ml)	-	-	80	80
Andromed (ml)	100	100		
Kuning telur % (v/v)			20	20
Glukosa (gram)			0.5	0.5
Gliserol % (v/v)	2.4	11.6	2.4	11.6
Steptomycine (μ g)			75.000	75.000
Peniciline (IU)			75.000	75.000
GSH (mM)	1.0	1.0	1.0	1.0

Catatan: *) 11 gram laktosa dilarutkan dalam 100 ml H₂O ;

Selanjutnya semen kerbau dari tiga perlakuan seminal plasma (BS-0, BS-50 dan BS-100) masing-masing dibagi dua bagian. Bagian pertama diencerkan dengan pengencer laktosa (Tabel 1-A), bagian yang lain diencerkan dengan pengencer komersial Andromed, sehingga total terdapat 6 perlakuan yaitu A-0, A50, A-100, L-0, L-50 dan L-100.

Pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi akhir sebesar 100×10^6 dilakukan dalam dua tahap pengenceran. Pengenceran tahap pertama dilakukan dengan menambahkan (50% total pengencer) pengencer menggunakan larutan pengencer A (Tabel 1) yang mengandung 2,4% Gliserol suhu 35°C. Pengenceran tahap ke dua dilakukan (50% total pengencer) pada saat pendinginan.

Pendinginan dilakukan menggunakan mesin pendingin selama kurang lebih 60 menit untuk mencapai suhu 5°C. Penambahan larutan pengencer B (Tabel 1) dilakukan secara bertahap pada suhu 15°C, 10°C dan 5°C, sehingga ketika pengenceran selesai diperoleh konsentrasi gliserol sebesar 7%.

Ekulibrasi pada 5°C dilakukan selama selama 4 jam. Dua jam ekulibrasi, semen dimasukkan dalam mini straw (0,25 ml), dan ekulibrasi dalam straw dilanjutkan selama 2 jam.

Pembekuan dilakukan setelah waktu ekulibrasi tercapai, straw dibekukan dengan jalan diuapkan diNitrogen (N₂) cair (8 cm diatas N₂ cair, selama 10 menit) dalam *styrofoam* yang tertutup rapat. Straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair dan kemudian disimpan dalam tanki nitrogen cair.

Evaluasi kualitas semen beku pasca-thawing dilakukan setelah satu minggu penyimpanan, straw di thawing dengan cara memasukkan starw ke dalam air (37°C) selama 15 detik. Pengamatan mikroskopik terhadap viabilitas spermatozoa (persentase motilitas=%M, persentase spermatozoa hidup=%H dan persentase tudung akrosom utuh=%TAU) dilakukan pada tiap tahapan yaitu saat pengenceran, ekuilibrasi (suhu 5°C), setelah *thawing*.

Rancangan percobaan

Penelitian dilakukan dalam rancangan acak lengkap pola faktorial 2x3, sebagai faktor pertama adalah jenis pengencer semen (Laktosa vs AndroMed) dan faktor kedua adalah penggantian seminal plasma sapi sebanyak 0%, 50% dan 100% (BS0, BS50 dan BS100). Semua data yang diperoleh, kecuali data semen segar di analisa statistik menggunakan analisa variansi dan perbedaan rata-rata diuji dengan Duncan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas semen segar

Tabel 2. Rataan kualitas semen segar kerbau rawa yang digunakan dalam penelitian

Penilaian	Kerbau 1	Kerbau 2	Rata-rata
Makroskopik:			
Volume (ml)	1,44 ± 0,52	1,76 ± 0,92	1,80±0,67
Warna	krem keputihan	krem keputihan	Krem keputihan
Konsistensi	encer – kental	encer – kental	Encer-kental
Mikroskopik:			
Konsentrasi (juta/ml)	1070 ± 271	1983 ± 283	97,88±18,23
Gerakan massa*	++ s/d +++	+++	++ - +++
Persentase sperma hidup (%)	82,17 ± 6,40	87,93 ± 4,76	83,94±2,46
Persentase Tudung Akrosom Utuh (%)	82,67 ± 2,07	81,59 ± 3,65	64,18±12,30
Persentase Membran Plasma Utuh (%)	76,75 ± 12,42	73,00 ± 8,60	79.29±5,74

+++ sangat baik

Kualitas semen segar (Tabel 2) merupakan rata-rata dari enam kali penampungan semen dari dua ekor kerbau rawa. Kualitas semen yang dipakai cukup baik dan dalam kisaran normal yang layak untuk dilakukan proses pembekuan.

Secara umum baik volume, konsentrasi spermatozoa, gerakan massa dan persentase sperma hidup, MPU dan TAU kedua kerbau baik dan layak baik dan layak untuk dilakukan pembekuan sesuai dengan kualitas umum semen segar kerbau (Vale, 1997).

Semen segar dengan kualitas gerakan massa +++ dengan % sperma hidup yang lebih dari 80% diharapkan akan menghasilkan semen beku dengan motilitas spermatozoa yang baik, karena selama proses pembekuan semen akan menurunkan rata-rata kualitas semen lebih 30%. Dengan motilitas awal minimal sebesar 70% (diperoleh dari nilai gerakan massa ++ - +++) diharapkan akan dapat diperoleh nilai PTM minimal 40% sesuai dengan (BSN 2017) yang berlaku untuk kualitas semen beku kerbau.

Kualitas Semen Beku

Penggunaan media AndroMed menghasilkan nilai Post thawing motility (PTM) yang lebih baik ($P < 0.05$) dibandingkan laktosa (27,6 vs 6,6%). Meskipun penggantian plasma semen sapi mempunyai kecenderungan memperbaiki nilai PTM, namun nilai PTM yang didapatkan tidak berbeda nyata. Beberapa penelitian pembekuan semen ejakulat kerbau telah dilakukan dengan penggantian plasma semen sapi (Lodhi *et al.* 1998, *Amien et al.* 1999, Herold 2004),

hasil yang didapatkan masih bervariasi dari cenderung lebih baik sampai sangat nyata memperbaiki viabilitas spermatozoa ejakulat

Tabel 3. Motilitas pasca-Thawing Spermatozoa (PTM) kerbau dalam 0, 50 dan 100% seminal plasma sapi yang diencerkan dalam media pengencer AndroMed dan laktosa

Tahapan	Media	Plasma semen			Rata-rata
		BS-0	BS-50	BS-100	
Pengenceran	Andromed	25,0±11,6	30,0 ±10,6	27,8±10,4	27,6±10,7 ^a
	Laktosa	5,0±4,8	6,0±4,5	7,0±4,6	6,6±4,6 ^b
Rata-rata		15,0±12,0 ^a	18,0±10,6 ^a	17,4±11,56 ^a	

^{ab}Superskrip yang berbeda dalam kolom dan baris yang sama berbeda nyata (P<0,05)

Penggunaan pengencer laktose menghasilkan nilai PTM yang jauh lebih rendah dibandingkan AndroMed, mungkin disebabkan karena pengencer laktosa tidak memiliki sistem buffer (Tabel 1). Selama proses pembuatan semen beku, spermatozoa dan kontaminan mikrobial menghasilkan metabolit yang menyebabkan metabolisme dan motilitas sperma menurun (Yeniz et al 2011). Tidak adanya sistem bufer pada pengencer laktosa mungkin menjadi salah satu penyebab rendahnya nilai PTM laktosa, sementara sebagai pengencer komersial AndroMed sudah pasti dilengkapi dengan sistem buffer. Buffer diperlukan dalam pengencer karena produk metabolisme spermatozoa akan berpengaruh terhadap pH lingkungan (Rasul et al. 2000). Penggunaan pengencer serupa (Bioxcell[®] and the Biociphos) pada pembekuan semen kerbau dilaporkan juga memperbaiki PTM di bandingkan penggunaan pengencer kuning telur yaitu pengencer tris-kuning telur (Bard 2008)

Tidak dijumpai adanya perbedaan nyata dari penggunaan androMed dan laktosa, maupun pada penggunaan plasma semen sapi terhadap nilai %H dan TAU (Tabel 4 dan 5), namun begitu pengencer laktosa cenderung lebih baik di banding AndoMed.

Tabel 4. Persentase hidup (%H) spermatozoa kerbau pasca-thawing dalam 0, 50 dan 100% seminal plasma sapi yang diencerkan dalam media pengencer AndroMed dan laktosa

Tahapan	Media	Plasma semen			Rata-rata
		BS-0	BS-50	BS-100	
Pengenceran	AndroMed	41,9±16,5	41,4±10,6	39,3±11,8	41,6±10,6 _a
	Laktosa	42,8±13,9	43,9±13,8	43,9±16,8	43,6 ±14,6 ^a
Rata-rata		43,4±12,2 ^a	42,7±12,2 ^a	41,6±12,2 ^a	

^{ab}Superskrip yang berbeda dalam kolom dan baris yang sama berbeda nyata (P<0,05)

Tabel 5. Persentase Tudung Akrosom Utuh (%TAU) spermatozoa kerbau pasca-thawing dalam 0, 50 dan 100% seminal plasma sapi yang diencerkan dalam media pengencer AndroMed dan laktosa

Tahapan	Media	Plasma semen			Rata-rata
		BS-0	BS-50	BS-100	
Pengenceran	AndroMed	46,3±9,5	43,0±11,6	44,8±13,3	44,7±11,4 ^a
	Laktosa	50,1±8,3	49,8±13,1	46,3±10,5	48,8±3,9 ^a
Rata-rata		48,2±9,0 ^a	46,2±12,6 ^a	45,6±11,0 ^a	

^{ab}Superskrip yang berbeda dalam kolom dan baris yang sama berbeda nyata (P<0,05)

Kuning telur dengan kandungan phospolipid memberikan perlindungan yang cenderung lebih baik terhadap membran plasma, terutama dalam melindungi membran akrosom. Persentase hidup pada saat thawing pada media laktosa sebesar 43,6% cenderung lebih tinggi dibandingkan pada androMed sebesar 41,6%. Hal yang sama ditemukan pada parameter TAU yang lebih baik pada media laktosa yang mengandung kuning telur dibandingkan androMed yang berbasis pada soya lechitin.

KESIMPULAN

Penggunaan media pengencer komersial AndroMed menghasilkan nilai PTM yang lebih baik dibandingkan pengencer laktosa, namun tidak pada nilai %H dan %TAU. Penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi tidak menghasilkan perbaikan kualitas pascathawing.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan untuk Badan Litbang Pertanian yang telah membiayai penelitian melalui dana APBN-Balitnak. Tidak lupa penulis sampaikan terimakasih kepada teknisi dan petugas kandang yang telah membantu dalam pengumpulan data di kandang percobaan dan Lab. Reproduksi Balitnak.

DAFTAR PUSTAKA

- Aires A, KD Hinsch, F Müller-Schlösser, K Bogner, S Müller-Schlösser, E Hinsch. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 60, pp. 269-279
- Ahmad M, Khan A, Shah ZA, Ahmad KM. 1996. Effect of removal seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 41:193-199
- Andrabi SHN. 2009. Factor affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 44: 552-569
- Amien MR, Mozes RT, Tuty L, Situmorang P. 1999. Pengaruh plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau (*Bubalus bubalis*). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 4(3): 143-147
- Arifiantini R I dan TL Yusuf. 2010. Developing of Tris Soy Milk Diluent for Frisian Holstein Bull Frozen Semen. *Hayati J. of Bioscience.* [vol 17. Issue 2.](#) Pages 91-94
- Asadpour R, A; Ivi-shoushtari SM, Asri Rezaii, Ansari MHKM. 2007. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma protein and their relation with semen freezability. *Anim. Rep. Sci.* 102: 308-313.
- Badan standardisasi Nasional. 2017. SNI 486-2: Semen Beku: Bagian 2: Kerbau.
- Bhattacharya P. 1974. *Reproduction of Buffalo*. Food and Agriculture Organization. Of United Nation, Rome.
- Cockril WR. 1974. *The husbandry of domestic buffalo*. Food and Agriculture Organization. Of United Nation, Rome.
- Goyal RL, Tuli RK, Georgie GC, Chad D. 1996. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration. *Theriogenology* 46: 679-686
- Lodhi LA, Qureshi ZI, Chohan FR, Iqbal J, Ahmad. 1998. Effect of Substitution of buffalo bull seminal plasma with that of cow bull on lifeability and conception rate. *Pakistan J. Biol. Sci.* 1 (4):402-404

- Herold FC, Aurich JE, Gerber DE. 2004. Epididymal sperm from African buffalo (*syncerus cefer*) can be frozen successfully with AndroMed and with Triladyl™ but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61:255-260
- J.L. Yániz, J.A. Mateos, P. Santolaria. 2011. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15°C. *Small Rumin Res*, 95: 54-60
- Kusumaningrum DA, Situmorang P, Triwulanningsih E, Siantiri RG. 2007. Penambahan plasma semen sapi dan antioksidan Glutatio untuk meningkatkan Kualitas semen beku kerbau lum (*Bubalus bubalis*). Prosiding seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan p:1188-184
- MR Bard . 2008. Cryopreservation of Buffalo spermatozoa in Soy Lecithin based extender. *Assiut Vet Med J*, 54 :pp. 272-284
- Shahni KL, Mohan G. 1990. Effect Removal of plasma on preservation of bovine semen. *Indian J. anim. Sci.* 60:783-785
- Rasul Z, M. Anzar, S. Jalali, N. Ahmad. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, 59 (2000), pp. 31-41
- Vale WG. 2010. Deep freezing buffalo semen-state of art. Proceeding 9th World Buffalo Congress. Buenos Aires, Brazil