

Pengaruh Konsentrasi Gliserol dalam Pengencer *Tris-Soya* terhadap Motilitas Spermatozoa Kambing Boer Sebelum dan Sesudah Pembekuan

The Effect of Glycerol Concentration in the Tris-Soya Diluent on the Motility of Boer Goat Spermatozoa Before and After Freezing

M. Fadhil Fahrur Rozi*, Nur Ducha

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: fadhilrozi0136@gmail.com

Abstrak. Dalam proses pembekuan spermatozoa diperlukan tambahan pengencer yang mengandung krioprotektan ekstraseluler dan intraseluler. Gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang dapat berdifusi ke dalam sel spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi gliserol terbaik dalam pengencer tris-citric-acid soya terhadap motilitas spermatozoa kambing Boer sebelum dan sesudah pembekuan. Dalam penelitian ini dilakukan pengamatan motilitas spermatozoa sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan konsentrasi gliserol (0%, 5%, 6%, 7%, 8%) dan empat pengulangan. Data dianalisis menggunakan uji Anava satu arah dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi gliserol 7% memiliki nilai motilitas sebelum pembekuan terbaik sebesar $67.50 \pm 3.79\%$ dan sesudah pembekuan sebesar $42.50 \pm 1.67\%$. Simpulan dari penelitian ini adalah penambahan konsentrasi gliserol 7% dalam pengencer tris-citric-acid soya dapat mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer yang disimpan dalam nitrogen cair dan merupakan konsentrasi terbaik.

Kata kunci: gliserol; kambing Boer; kualitas spermatozoa; pengencer tris-citric-acid soya

Abstract. In the sperm freezing process required diluents additional that contain extracellular and intracellular cryoprotectants. Glycerol is an intracellular cryoprotectant that can diffuse into sperm cells. This study aimed to determine the best concentration of glycerol in tris-citric-acid soya diluents on Boer goat sperm motility. In this research, spermatozoa motility was observed before freezing and after freezing. The research designed by using Completely Randomized Design with five treatments of glycerol concentration (0%, 5%, 6%, 7%, 8%) and four repetitions. Data were analyzed by using one-way ANOVA test and the Duncan test. The results showed that glycerol 7% had the best of before freezing motility were $61.25\% \pm 1.90$ and after freezing were $43.13\% \pm 0.72$. The conclusions of this study was the addition of concentration glycerol 7% in the tris-citric-acid soya diluent maintained the motility of Boer goat sperm stored in liquid nitrogen and it was the best concentrations.

Key words: glycerol; boer goat; sperm quality; tric-citric-acid soya diluent

PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) merupakan suatu proses memasukkan semen ke dalam saluran reproduksi betina saat masa estrus dengan menggunakan *inseminator gun* yang dilakukan oleh inseminator. Keberhasilan inseminasi buatan pada kambing selaras dengan kualitas semen kambing setelah dilakukan penyimpanan. Sebelum dilakukan proses pembekuan dan penyimpanan dalam suhu sangat rendah rendah -196°C , diperlukan penambahan krioprotektan dalam pengencer semen untuk melindungi efek negatif bagi membran spermatozoa (Ducha *et al.*, 2012).

Salah satu jenis pengencer yang sudah dikembangkan adalah tris dasar soya yang telah dilakukan oleh Noviansyah (2016) menunjukkan bahwa penambahan soya dalam pengencer *Tris-Citric-Fructose* (TCF) dapat mempertahankan kualitas spermatozoa kambing Boer dan memenuhi syarat untuk pelaksanaan IB. Modifikasi yang dilakukan dalam upaya pengembangan pengencer *Tris-Citric-Acid Soya* adalah penambahan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler untuk menjaga kualitas spermatozoa selama proses pembekuan.

Penambahan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler dapat membantu mengurangi kematian spermatozoa kambing Boer saat pembekuan. Gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang dapat berdifusi ke dalam sel spermatozoa (Susilawati, 2011). Gliserol dalam pengencer dapat mencegah terjadinya dehidrasi karena memiliki daya pengikat air yang kuat (Mumu, 2009). Penggunaan gliserol harus memperhatikan konsentrasi yang tepat agar dapat berfungsi dengan baik. Apabila konsentrasi kurang, daya protektif tidak optimal, sebaliknya jika terlalu berlebihan akan menjadi toksik bagi spermatozoa (Rizal, 2005).

Penelitian ini merupakan pengembangan dari penelitian Noviansyah (2016) yang menggunakan pengencer alternatif *tris-soya* dalam mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer setelah proses pembekuan. Sejauh ini belum ada studi mengenai konsentrasi gliserol yang tepat dalam pengencer *tris-citric-acid soya* untuk mempertahankan motilitas spermatozoa setelah pembekuan. Hal ini didukung oleh Ihsan (2013) yaitu mendapatkan konsentrasi gliserol terbaik yang ditambahkan dalam pengencer Andromed untuk mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi gliserol terbaik dalam pengencer *tris-citric-acid soya* yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer sebelum dan sesudah pembekuan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Lapang *Teaching Farm* Universitas Airlangga, Gresik. Pembuatan pengencer semen dilaksanakan di Laboratorium Biologi Dasar, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Surabaya.

Pembuatan pengencer dilakukan dalam beberapa tahapan antara lain sterilisasi dan proses pembuatan pengencer. Bahan yang digunakan untuk pembuatan pengencer *Tris-Citric-Acid Soya* yaitu tris, asam sitrat, fruktosa, penisilin, streptomisin, dan soya. Bahan-bahan tersebut dihomogenkan dengan aquades steril dan kemudian diberikan perlakuan penambahan berbagai konsentrasi gliserol 5%, 6%, 7%, 8% dan tanpa penambahan gliserol.

Penampungan semen dilakukan menggunakan vagina buatan. Persiapan vagina buatan meliputi *setting* vagina buatan, penambahan air hangat $\pm 37^{\circ}\text{C}$ untuk penyesuaian suhu vagina buatan dengan penis kambing, dan penambahan *vaseline* sebagai pelumas buatan. Penampungan semen menggunakan betina pemancing dan pejantan dewasa.

Pengenceran semen dilakukan tiga tahap, pengenceran A1 dan A2 dilakukan di suhu 37°C , sedangkan pengenceran B dilakukan di dalam *cool tube* dengan suhu 5°C dan dilakukan perlakuan penambahan berbagai konsentrasi gliserol (5%, 6%, 7%, 8%, dan tanpa penambahan gliserol). Pengenceran A1 dan pengenceran A2 dilakukan pada suhu 36°C dalam *water bath* kemudian diturunkan bertahap menjadi suhu 5°C . Tahap pengenceran A1 yakni volume total semen yang ditampung ditambahkan larutan pengencer dengan perbandingan 1:1, selanjutnya langsung ditambahkan pengencer A2. Adapun perhitungan volume larutan pengenceran A2 yang ditambahkan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V_{A2 \text{ yang ditambahkan}} = \frac{V_{\text{total}}}{2} - \sum \text{Vol. semen} + \text{Volume A1}$$

Sebelum didapatkan nilai pengenceran A2 yang ditambahkan, terlebih dahulu dihitung nilai V_{total} yang diperoleh dari rumus di bawah ini:

$$V_{\text{total}} = \frac{V_{\text{semen}} \times \text{konsentrasi spermatozoa} \times 0,25}{50 \times 10^6}$$

Semen yang sudah diencerkan dalam pengenceran A1 dan pengenceran A2 disimpan di dalam *cool tube* hingga suhu diturunkan menjadi 5°C , kemudian ditambahkan pengencer B yang sudah ditambahkan berbagai perlakuan konsentrasi gliserol. Volume pengencer B yang ditambahkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$V_{\text{pengencer B yang ditambahkan}} = \frac{V_{\text{total}}}{2}$$

Proses pembekuan semen kambing dimulai dari proses penurunan suhu 3-5°C di dalam *cool tube*, setelah itu semen dilakukan *filling* dan *sealing*. Langkah selanjutnya yaitu *pre freezing*, *straw* diletakkan di atas uap nitrogen cair dengan jarak ± 2 cm selama ± 10 menit dengan suhu -140°C. Setelah itu, dilakukan *freezing* dengan suhu -196°C. Pembekuan dilakukan selama 1x24 jam yang kemudian dilakukan proses pengamatan motilitas sesudah pembekuan.

Pengamatan semen dilakukan dua tahap, yaitu pengamatan motilitas sebelum pembekuan untuk mengetahui kelayakan semen kambing sebagai syarat dilanjutkan ke proses pembekuan dan pengamatan sesudah pembekuan dilakukan setelah semen dilakukan proses pembekuan selama 1 x 24 jam yang sudah dilakukan *thawing* dalam air hangat suhu 37°C selama 3-5 detik. Proses pengamatan yaitu dengan cara meletakkan semen dengan *stick glass* di atas kaca objek yang kemudian ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan motilitas dilakukan dengan mikroskop perbesaran 400x yang dilakukan oleh dua orang dan data berupa persentase yang dihitung reratanya.

Analisis data dari hasil pengamatan motilitas individu berupa persentase yang diperoleh dari dua orang. Data persentase motilitas ditransformasikan terlebih dahulu dengan menggunakan transformasi arc sin, data berdistribusi normal dianalisis menggunakan uji Anava satu arah dan dilanjutkan menggunakan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan pada tiap perlakuan.

HASIL

Hasil pengamatan rata-rata motilitas spermatozoa dan standar deviasi kambing Boer didapatkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa pada saat sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan. Hasil uji Duncan ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa persentase motilitas sebelum pembekuan pada perlakuan kontrol yaitu pengencer *Tris-Citric-Acid Soya* tanpa penambahan gliserol memiliki perbedaan nyata dengan perlakuan pengencer *tris-citric-acid* soya yang ditambahkan gliserol, sedangkan pada perlakuan konsentrasi gliserol 6% tidak berbedaan nyata dengan 8%. Pada pengamatan sebelum pembekuan hasil teritnggi didapatkan pada gliserol konsentrasi 7%, sedangkan hasil terendah didapatkan pada gliserol konsentrasi 0%. Hasil uji Duncan ($\alpha=0,05$) pada persentase motilitas sesudah pembekuan menunjukkan terdapat perbedaan nyata antarperlakuan. Pada pengamatan *post thawaing* hasil teritnggi didapatkan pada gliserol konsentrasi 7%, sedangkan hasil terendah didapatkan pada gliserol konsentrasi 0% (Tabel 1.).

Tabel 1. Persentase motilitas \pm standar deviasi spermatozoa kambing Boer dengan berbagai konsentrasi gliserol dalam pengencer *Tris-Citric-Acid Soya* (%)

Perlakuan Gliserol	Rata-Rata Persentase Motilitas Dan Standar Deviasi	
	Sebelum Pembekuan	Sesudah Pembekuan
0%	23,13 \pm 3,14 ^a	3,75 \pm 2,21 ^a
5%	33,13 \pm 4,23 ^b	8,13 \pm 3,22 ^b
6%	51,25 \pm 2,99 ^c	28,13 \pm 1,53 ^d
7%	67,50 \pm 3,79 ^d	42,50 \pm 1,67 ^e
8%	44,38 \pm 5,50 ^c	20,00 \pm 1,47 ^c

Keterangan : Notasi yang berbeda (a,b,c,d,e) pada baris yang sama menunjukkan bahwa perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata. ^a= notasi persentase terburuk, ^e = notasi persentase terbaik.

PEMBAHASAN

Penyimpanan spermatozoa pada suhu rendah mempengaruhi kualitas dan mengalami penurunan motilitas pada saat sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan. Ducha (2012) menyatakan bahwa proses penyimpanan spermatozoa pada suhu rendah menimbulkan kerugian baik secara struktural maupun fungsional sehingga dapat menurunkan motilitas spermatozoa. Hasil yang terbaik berdasarkan uji Duncan ($\alpha=0,05$) didapatkan pada pengencer *Tris-Citric-Acid Soya* dengan konsentrasi gliserol 7%. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Ihsan (2013) bahwa penambahan gliserol 7% dalam pengencer *Andromed* mampu mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer sebesar 30,00 \pm 12,65%. Hasil penelitian ini juga tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Solihati dkk., (2018) yang mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sesudah pembekuan domba lokal sebesar 40.76 \pm 2.82% dalam pengencer tris kuning telur dengan konsentrasi gliserol 5%. Namun hasil penelitian Islamiati dkk., (2016) bahwa penambahan gliserol 6% dalam pengencer tris kuning telur mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sesudah pembekuan domba lokal sebesar 58.66%.

Penambahan gliserol 7% dalam pengencer *Tris-Citric-Acid* Soya merupakan konsentrasi terbaik dan mampu mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer dengan melindungi membran sel spermatozoa dari pengaruh proses pembekuan. Pada proses pembekuan, gliserol akan memodifikasi kristal es yang terbentuk dan menghambat kerusakan membran yaitu kerusakan organel-organel sel spermatozoa seperti lisosom mitokondria (Tambing dkk., 2000). Gliserol dengan mekanisme tersebut mampu menjaga keseimbangan air di dalam sel agar tidak keluar sebagai akibat perubahan dari tekanan osmotik. Mumu (2009) berpendapat bahwa, gliserol memiliki 3 gugus hidroksil yang dapat mengikat air.

Gliserol memiliki berbagai fungsi dalam pengencer ketika proses pembekuan. Gliserol selain menjadi senyawa yang berfungsi sebagai krioprotektan juga menjadi salah satu sumber energi. Dalam mekanismenya gliserol dapat dimetabolisme (Holt, 2000). Sumber energi dalam pengencer berperan untuk mempertahankan *survival* ketika dan setelah pembekuan semen khususnya pada saat proses *Thawing*. Energi untuk motilitas spermatozoa dihasilkan dari perombakan *adenosin triphospat* ATP di dalam selubung mitokondria melalui reaksi penguraian menjadi *adenosin diphospat* (ADP) dan *adenosin monophospat* (AMP) (Garner dan Hafez, 2008).

Energi dalam sel spermatozoa ketika proses pembekuan dapat berkurang dan habis. Sebagian besar sumber energi didapat dari karbohidrat dan lipid. Menurut Tambing dkk., (2000) gliserol merupakan hasil hidrolisis lipid (trigliseraldehida). gliserol didalam sel spermatozoa tidak menjadi sumber energi utama. Kristanto (2004) menyatakan, lipid dalam bentuk gliserol dalam sel akan dimetabolisir jika energi yang dihasilkan dari metabolisme fruktosa atau glukosa sudah habis. Siswanto (2006) menambahkan bahwa *glyceryl phosphoryl choline* dapat dimetabolisir melalui jalur yang sama seperti pada fruktosa maupun glukosa. Ilyas (2009) juga berpendapat bahwa, mekanisme kerja gliserol yaitu menghasilkan energi melalui siklus perombakan fruktosa pada triosa fosfat dan selanjutnya akan dirombak menjadi asam laktat.

Konsentrasi gliserol yang rendah dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa kambing Boer. Azizah dan Arifiantini (2009) menambahkan Jika konsentrasi gliserol rendah maka fungsi gliserol sebagai pengikat air bebas dalam sel tidak optimal. Kondisi konsentrasi gliserol yang rendah mengakibatkan banyaknya kandungan air bebas di dalam sel dan dapat membentuk kristal es ketika proses pembekuan. Menurut Rizal dan Herdis (2008) Pembentukan kristal es yang besar akan menghancurkan ikatan seluler yang penting dan akan menyebabkan kematian sel saat pembekuan. Kurnia dkk., (2012) juga menambahkan bahwa kadar gliserol yang terlalu rendah atau tinggi tidak akan efektif menjalankan fungsi proteksinya.

Konsentrasi gliserol yang tinggi juga dapat menimbulkan kematian spermatozoa kambing ketika proses pembekuan. Azizah dan Arifiantini (2009) menyatakan bahwa dengan konsentrasi gliserol yang tinggi dapat menimbulkan efek toksik. Ihsan (2013) menambahkan apabila konsentrasi gliserol dalam pengencer terlalu tinggi, maka akan terbentuk lebih banyak asam laktat yang dapat menurunkan pH dan bersifat racun bagi spermatozoa.

SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan konsentrasi gliserol 7% dalam pengencer *Tris-Citric-Acid* Soya mampu mempertahankan motilitas spermatozoa kambing Boer sebelum dan sesudah pembekuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah and Arifiantini, 2009. Kualitas Semen Beku Kuda pada Pengencer Susu Skim dengan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda. *Jurnal Veteriner*. Vol. 10(2): 63-70. ISSN: 1411 - 8327
- Ducha N, 2012. Suplementasi Kuning Telur Dalam Pengencer CEP-2 Terhadap Kualitas dan Integritas membran Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Suhu 4 - 5 °C. *Disertasi*: Malang: UNBRA.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Sri W and Mulyoto P, 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*. Vol. 15(20): 979-985.
- Garner DL and Hafez ESE, 2008. *Spermatozoa and Plasma Semen*. USA.
- Hafez ESE, 2008. *Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals 7 the edition*. Maryland, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproductive Science*. Vol. 62: 3-22.

- Ihsan MN, 2013. Pembekuan Vitriifikasi Semen Kambing Boer dengan Tingkat Gliserol Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. Vol. 14(2): 38-45
- Ilyas and Mumu M, 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Agroland*. Vol. 16(2) : 172.
- Islamiati MU, Darodjah RS and Soeparna. 2016. Pengaruh Level Gliserol dalam Pengencer Tris-Sitrat Kuning Telur terhadap Motilitas dan Abnormalitas Sperma Kambing Peranakan Etawah *Post Thawing*. *Jurnal Peternakan Universitas Padjadjaran*.
- Kristanto, 2004. Peranan Gliserol dan Fetal Bovine Serum dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian bogor
- Kurnia D, Zaituni U and Jaswandi. 2012. Pengaruh Level Gliserol Pada pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Pesisir. *Jurnal Green Swarnadwipa*. Vol. 2(2): 27-35.
- Mumu IM, 2009. Viabilitas Semen Sapi Simmental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Agroland*. Vol. 16(2): 172-179.
- Noviansyah L, 2016. Pengaruh Penambahan Soya dalam Pengencer Dasar *Tris-Citric Acid-Fructose* (TCF) Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Pasca Pembekuan. *Skripsi*. Universitas Negeri Surabaya
- Rizal M, 2005. Fertilitas Spermatozoa Ejakulat dan Epididimis Domba Garut Hasil Kriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris dengan Berbagai Krioprotektan dan Antioksidan. *Disertasi*. Bogor: Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Rizal M and Herdis, 2008. *Inseminasi Buatan pada Domba*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Siswanto, 2006. Kualitas Semen di dalam Pengencer Tris dan Natrium Sitrat dengan Berbagai Sumber Karbohidrat dan Level Gliserol Pada Proses Kriopreservasi Semen Rusa Timor (*Cervus timorensis*). *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Solihati N, Rasad SD, Setiawan R and Nurjanah S. 2018. Pengaruh Kadar Gliserol terhadap Kualitas Semen Domba Lokal. *Jurnal Biodjati*. Vol. 3(1): 63-71
- Susilawati T, 2011. *Spermatozoatology*. Malang. Universitas Brawijaya Press.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL and Utama IK, 2000. Pengaruh Gliserol dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. *JITV*. Vol. 5: 84.

Published: 31 Januari 2020

Authors:

M. Fadhil Fahrur Rozi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: fadhilrozi0136@gmail.com
 Nur Ducha, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt. 2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: nurducha@unesa.ac.id

How to cite this article:

Rozi MFF, Ducha N, 2020. Pengaruh Konsentrasi Gliserol dalam Pengencer Tris-Soya terhadap Motilitas Spermatozoa Kambing Boer Sebelum dan Sesudah Pembekuan. *LenteraBio*; 9(1): 12-16