

**Analisis Viabilitas Spermatozoa Sapi Friesian Holstein (*Bos taurus*)
Post Thawing Semen Beku Dengan Pengaruh Suhu dan Lama Waktu
Thawing Berbeda**

***Spermatozoa Viability Analysis of Post Thawing Semen of the Friesian
Holstein Cow (Bos taurus) with Different Effects of Temperature and
Length of Thawing Time***

Dewi Malinda^{1 *)}, Hari Santoso^{2 **)}, Husain Latuconsina³
^{1,2,3}Jurusan Biologi, F-MIPA Universitas Islam Malang, Indonesia

ABSTRAK

Prinsip pembekuan semen adalah untuk mempertahankan kelangsungan hidup sperma dalam jangka waktu yang lama (*long term preservation*). Thawing adalah proses pencairan kembali semen beku sapi sebelum digunakan dalam proses inseminasi buatan (IB). Pencairan ini memiliki pengaruh besar pada keadaan sperma, terutama pada integritas sperma dalam semen, tergantung pada suhu dan lamanya waktu. Pemilihan suhu dan lama waktu thawing yang baik dan tepat dapat mencegah kerusakan spermatozoa. Tujuan penelitian untuk menganalisa pengaruh perbedaan suhu dan lama waktu post thawing terhadap viabilitas spermatozoa sapi FH (Friesian Holstein) dan mencari suhu dan lama waktu thawing yang optimal dalam proses IB. Metode penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan RAK dengan 3 perlakuan kelompok dan 2x ulangan. Bahan penelitian menggunakan semen beku sapi FH dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari. Variabel yang diamati adalah Viabilitas dengan pewarnaan Eosin 2%. Analisis data menggunakan uji ANOVA Faktorial. Hasil penelitian diperoleh lama waktu thawing tidak berbeda secara signifikan yaitu $P > 0,05$, suhu 25°C 20 detik : 66,30%, 25°C 30 detik : 66,80%, 25°C 40 detik : 63,30%, 37°C 20 detik : 65,00%, 37°C 30 detik : 74,30%, 37°C 40 detik : 69,00%, 40°C 20 detik : 75,50%, 40°C 30 detik : 65,50%, 40°C 40 detik : 67,50%, presentase hidup (Viabilitas) spermatozoa tertinggi terdapat pada suhu 40°C dengan lama waktu 20 detik dengan nilai 75,50%. Semakin tinggi suhu dengan waktu thawing yang singkat dapat mendukung tingginya viabilitas.

Kata Kunci: *Bos taurus*, Semen beku, Thawing, Viabilitas Spermatozoa

ABSTRACT

The principle of freezing semen is to maintain the survival of sperm in the long term (long term preservation). Thawing is the process of thawing frozen cattle semen before it is used in the artificial insemination process (IB). This thawing has a big influence on the state of sperm, especially on the integrity of sperm in semen, depending on the temperature and length of time. The choice of temperature and length of time thawing is good and right can prevent damage to spermatozoa. The purpose of this study was to analyze the effect of differences in temperature and the length of post thawing time on the viability of FH (Friesian Holstein) cow spermatozoa and to find the optimal temperature and length of thawing time in the IB process. The research method was experimental using RAK with 3 treatment groups and 2x replications. The research material used frozen semen of FH cattle from the Singosari Center for Artificial Insemination (BBIB). The observed variable was Viability with Eosin staining of 2%. Data analysis used the Factorial ANOVA test. The results of this study are the length of time thawing did not differ significantly namely $P > 0.05$, temperature 25 ° C 20 seconds: 66.30%, 25 ° C 30 seconds: 66.80%, 25 ° C 40 seconds: 63, 30%, 37 ° C 20 seconds: 65.00%, 37 ° C 30 seconds: 74.30%, 37 ° C 40 seconds: 69.00%, 40 ° C 20 seconds: 75.50%, 40 ° C 30 seconds: 65.50%, 40 ° C 40 seconds: 67.50%, the highest percentage of life (viability) of spermatozoa is at 40°C with a duration of 20 seconds with a value of 75.50%. Conclusions the higher temperature with the short thawing time can support the high viability.

Keywords: *Bos taurus*, Frozen semen, Thawing, Spermatozoa Viability

^{*)} Dewi Malinda, Jurusan Biologi, Jurusan Biologi FMIPA UNISMA, Jl. MT Haryono 193, Malang 65144, Telp. 085807287530, email: dewimalinda52.dm@gmail.com

^{**)} Drs. Hari Santoso, M.Biomed. Jurusan Biologi, Jurusan Biologi FMIPA UNISMA, Jl. MT Haryono 193, Malang 65144, email: harisantoso.m.biomed@gmail.com

Diterima Tanggal 15 Agustus 2019 – Dipublikasikan Tanggal 25 Januari 2021

Pendahuluan

Sapi FH (*Frisian Holstein*) adalah sapi yang berasal dari provinsi Belanda Utara dan provinsi Friesland Barat. Ciri-ciri sapi FH adalah berbadan besar karena nafsu makan tinggi dan untuk sapi betina memiliki ambing yang besar. Berkepala panjang dan bertanduk kecil mengarah kedepan dan membengkok ke dalam [1].

Semen adalah hasil dari metabolisme organ reproduksi ternak jantan yang nantinya akan diejakulasi melalui penis untuk disalurkan ke dalam saluran kelamin betina pada saat terjadi kopulasi. Seiring dengan kemajuan teknologi, semen dapat ditampung dengan beberapa cara untuk keperluan IB [2]. Spermatozoa merupakan komponen yang paling penting pada semen, sedangkan selain spermatozoa, semen juga terdiri dari plasma semen. Fungsi utama dari spermatozoa adalah untuk membuahi ovum [3].

Viabilitas merupakan presentase hidup sel spermatozoa yang ditandai dengan sedikit sekali bahkan tidak menyerap warna Eosin 2% sedangkan sel sperma yang sudah mati akan mengambil warna karena permeabilitas dinding meningkat sewaktu mati [4].

Thawing merupakan proses pencairan kembali semen yang telah dibekukan sebelum digunakan untuk kegiatan inseminasi buatan. Lama waktu dan suhu thawing berpengaruh nyata terhadap kualitas spermatozoa, khususnya terhadap kelengkapan sel spermatozoa pada semen. Semen yang berkualitas sangat diperlukan pada program IB. Penilaian semen yang baik untuk inseminasi buatan tidak hanya dilihat secara kualitas tapi juga kuantitasnya, pada saat sebelum dibekukan maupun sesudah dibekukan. Suhu thawing yang sesuai di harapkan dapat mencegah kerusakan dari sel spermatozoa. Sehingga spermatozoa tetap memiliki kemampuan yang tinggi untuk membuahi ovum [5].

Cara pelaksanaan thawing yang berkembang dilapangan sangat beragam. Suhu thawing yang diatas 37°C diharapkan dapat meningkatkan motilitas atau viabilitas dari spermatozoa. Namun, apabila melebihi batas, waktu optimal justru akan merusak sel spermatozoa [6]. Nilai tertinggi dari presentase motilitas didapatkan dari suhu thawing 37°C [7]. Suhu yang tinggi dalam media yang nantinya digunakan untuk thawing dapat mengakibatkan siklus metabolisme spermatozoa meninggi sehingga memerlukan energi yang tinggi pula [8].

Suhu thawing berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa sapi FH (*Friesian Holstein*), di mana semakin tinggi suhu Thawing (46°C) justru semakin menurunkan presentase motilitas spermatozoa [9]. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kisaran suhu thawing yang optimal untuk mendukung motilitas spermatozoa. Selanjutnya mendapatkan suhu thawing 25°C masih layak untuk IB karena masih mendukung tingginya motilitas spermatozoa 41%, 40% adalah presentase minimal spermatozoa motil setelah thawing [10].

Merujuk kepada hasil penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan pengujian viabilitas spermatozoa post thawing dari semen beku khususnya pada sapi FH (*Friesian Holstein*) menggunakan suhu thawing dan lama waktu yang berbeda agar dapat mengetahui pengaruh suhu dan lama waktu thawing terhadap viabilitas spermatozoa semen beku sekaligus mengetahui suhu dan lama waktu thawing yang ideal untuk mendukung viabilitas spermatozoa sapi FH (*Friesian Holstein*).

Material dan Metode

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen beku sapi FH (*Friesian Holstein*), alcohol, Eosin 2%, air suhu (25°C, 37°C dan 40 °C).

Alat yang digunakan pada penelitian adalah mikroskop electron, gelas objek dan gelas penutup, cuvet, erlenmeyer, gelas ukur, spuit, mikropipet, camera handphond, stopwatch.

Metode

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian menggunakan metoda random sampling dari sperma beku yang tersedia. Metoda random sampling dilakukan dengan cara mengambil sperma dari sapi FH (*Friesian Holstein*) yang telah di bekukan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) yang terdiri dari 3 perlakuan, 3 kelompok dan 2 ulangan.

Cara Kerja

Penampungan semen dilakukan dengan AV (Artificial Vagina). Setelah lolos uji semen segar dan telah diencerkan menggunakan tris kuning telur selanjutnya dilakukan uji BF (*Before Freezing*). Selanjutnya semen yang lolos uji BF akan dilakukan *print straw* untuk memasukkan semen yang akan dibekukan. Sebelum dilakukan proses *freezing*, yaitu dilakukan dengan N₂ Cair dalam *storage container* maka dilakukan proses *prefreezing* dalam *digit cool*. Tahap PTM (*Post Thawing Motility*) dilakukan dengan perlakuan 3 suhu yang berbeda yaitu 25°C, 37°C dan 40°C dan 3 waktu yaitu 20, 30 dan 40 detik. Presentase spermatozoa yang hidup dapat dihitung menggunakan rumus [11] sebagai berikut:

$$\text{Rumus \% sperma hidup} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{jumlah total sel spermatozoa}} \times 100\%$$

Analisis Data: Analisis yang digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan atau tidak terhadap Presentase hidup (Viabilitas) spermatozoa dengan menggunakan uji ANOVA Faktorial dari dua factor yaitu suhu dan lama waktu Thawing dengan taraf signifikan 5% [12].

Hasil dan Diskusi

Pengamatan Viabilitas Spermatozoa Post Thawing Semen Beku Sapi FH (Frisian Holstein): Dari penelitian yang telah dilakukan di dapatkan hasil presentase viabilitas spermatozoa semen beku sapi FH (Frisian Holstein) pada Tabel 1.

Tabel 1. Presentase Viabilitas Spermatozoa Semen Beku Sapi FH (Frisian Holstein) dengan suhu dan lama waktu thawing yang berbeda

Perlakuan		Ulangan		Total (%)	Rata-rata (%)
Suhu thawing (°C)	Lama thawing (Detik)	I (%)	II (%)		
25	20	59	74	133	66,30
	30	65,50	68	133,5	66,80
	40	68,5	56	124,5	63,30
37	20	67	63	130	65,00
	30	70	78,50	148,5	74,30
	40	68,50	69,50	138	69,00
40	20	76	75	151	75,50
	30	65,50	65,50	131	65,50
	40	69	66	135	67,50

Hasil viabilitas tertinggi di dapatkan pada perlakuan T3t1 dengan menggunakan suhu 40°C pada waktu thawing selama 20 detik dengan nilai 75,50% dan viabilitas terendah terdapat pada suhu 25°C dengan lama waktu thawing 40 detik sebesar 63,30%. Semakin cepat tingkat perubahan selama pencairan, semakin banyak sperma yang layak hidup. Ini dapat dicapai pada saat melakukan proses pencairan menggunakan suhu air pencairan yang sangat tinggi [13]. Juga kecepatan (waktu) perubahan selama thawing akan mengurangi tekanan terhadap spermatozoa karena spermatozoa melewati massa kritis (fasa transisi) dengan cepat pula sehingga spermatozoa yang hidup dan normal akan menjadi lebih banyak dan akibatnya angka konsepsi menjadi lebih baik. Juga, laju perubahan waktu selama pencairan mengurangi tekanan pada sperma ketika sperma melewati massa kritis (fase

transisi) dengan cepat, sehingga menghasilkan lebih banyak sperma normal yang hidup, yang menjadikan tingkat konsepsi membaik. Penelitian yang telah dilakukan juga menemukan bahwa melakukan thawing semen dengan menggunakan temperature 40°C dapat menghasilkan motilitas dan daya hidup yang normal dan lebih tinggi dibandingkan melakukan thawing semen beku pada temperature 17°C, 5°C, 21°C [14].

Dalam penelitian ini, percobaan dengan pewarna eosin dapat membedakan sperma yang mati dan masih hidup. Sperma yang mati ditunjukkan dengan kepala sperma berwarna, dan sperma yang hidup ditunjukkan dengan kepala sperma yang menyerap sedikit atau tanpa warna. Hal ini dapat disebabkan ketika eosin bersentuhan langsung dengan sperma yang masih hidup maka cairan eosin ini tidak dapat menembus ke dalam sel sperma yang disebabkan membran sperma impermeable terhadap pewarna eosin, sedangkan pada sperma yang sudah mati selaput membrannya telah rusak, maka eosin dapat masuk ke sel sperma dengan mudah [15].

Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Thawing Terhadap Presentase Viabilitas Spermatozoa Sapi

FH (Friesian Holstein): Adapun hasil analisis yang telah dilakukan dengan menggunakan uji ANOVA faktorial seperti yang telah ditampilkan pada Tabel 2, menunjukkan bahwa hasil yang diperoleh tidak terdapat efek yang nyata atau tidak signifikan antara suhu dan lama waktu thawing karena nilai $P > 0,05$. Hal ini diperkirakan karena pemilihan suhu dan waktu yang relatif aman digunakan untuk Thawing pada saat akan melakukan IB. Pada suhu 25°C mendapatkan nilai di atas standart SNI yaitu di atas 50%, lama waktu thawing yang terbaik pada suhu 25°C adalah 30 detik dengan nilai rata-rata 66,80%, untuk itu suhu tersebut juga sering dipakai oleh orang yang hendak melakukan IB. Viabilitas normal spermatozoa yang dipakai IB membutuhkan 50% spermatozoa motil dan hidup [16]. Thawing di Negara Indonesia dilakukan dengan memakai air ledeng pada 15°C hingga 25°C selama 15 detik. Suhu thawing 25°C masih layak untuk IB karena masih mendukung tingginya motilitas spermatozoa 41% dimana jika motilitas tinggi maka nilai viabilitas juga otomatis tinggi. Oleh karena itu pada suhu 25°C yang menggunakan air kran atau air sumur itu boleh digunakan sebagai thawing dan harus menggunakan lama waktu thawing yang tepat [17].

Tabel 2. Hasil uji ANOVA Viabilitas Spermatozoa Sapi FH (Friesian Holstein) Pada Perlakuan Suhu dan Lama Waktu Thawing

	Jumlah Kuadrat	db	Kuadrat Tengah	F	P
Suhu	76.6	2	38.3	1.373	0.302
Waktu	27.6	2	13.8	0.495	0.626
Suhu+Waktu	194.8	4	48.7	1.747	0.224
Residuals	251.0	9	27.9		

Pada penelitian ini suhu 37°C mendapatkan nilai yang tinggi dengan lama waktu 30 detik dengan nilai 74,30% hal ini sesuai standart SNI 4869-1:2017 yang menyatakan bahwa pada tahapan ini di BBIB Singosari semen beku yang telah dicairkan kembali (thawing) pada suhu antara 37°C – 38°C selama 30 detik semen beku yang telah dicairkan tersebut harus menunjukkan nilai motilitas spermatozoa minimal 40 % dan gerakan individu spermatozoa minimal skor 2 (dua) dan jumlah sel spermatozoa minimum 25 juta per dosis. Pencairan di atas 37°C dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa, tetapi jika melebihi batas waktu kritis bisa mematikan sel spermatozoa. Dalam studi lain, persentase viabilitas semen beku seekor kerbau bernama sapi Ravi Nilli berkurang pada saat pencairan yang durasinya semakin lama dimana viabilitas tertinggi yaitu pada durasi thawing 30 detik

pada air bersuhu 37°C sebesar 79,3% dan menurun menjadi 77,0% pada durasi thawing 60 detik pada air bersuhu 37°C. Suhu thawing dengan lama waktu yang tidak sesuai dapat merusak selaput sperma akibat tekanan panas dan kontak dengan oksigen. Membran spermatozoa yang tersusun dari fosfolipid mengalami reduksi karena munculnya asam lemak dari proses peroksidasi sel [18]. Thawing dalam air 37 C untuk jangka waktu 15 detik tidak menciptakan tekanan osmotik yang ekstrim dalam membran sperma, sehingga tidak mengganggu permeabilitas membran. Hal ini menjamin keseimbangan yang baik antara fluiditas membran sel dan homeostasis untuk pertukaran senyawa yang normal. Selain itu, karena durasi thawing yang singkat, maka tidak ada peningkatan aktivitas metabolisme sperma dan tidak ada penurunan tingkat kelangsungan hidup spermatozoa[19].

Perubahan yang lebih cepat pada suhu thawing dapat menurunkan tekanan sperma dan memungkinkannya dengan cepat melewati periode ketidakstabilan (stabilitas), hal ini memungkinkan lebih banyak sperma untuk tetap hidup dan normal. Sperma masih hidup dan dapat digunakan lebih efektif karena waktu yang digunakan pada saat thawing lebih singkat. Suhu dan waktu pencairan memiliki pengaruh besar pada kondisi sperma, terutama integritas sperma dalam semen. Kombinasi suhu dan lama waktu pencairan yang baik adalah yang dapat menyebabkan sedikit atau tidak ada kerusakan pada sel spermatozoa, sehingga memiliki kemampuan untuk membuahi ovum yang tinggi [20].

Kesimpulan

Semakin tinggi suhu thawing dengan waktu yang semakin singkat dapat mendukung tingginya nilai viabilitas spermatozoa semen beku. Presentase hidup spermatozoa (Viabilitas) tertinggi didapatkan pada suhu 40°C dan waktu 20 detik dengan nilai 75,50%.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari yang telah mengarahkan hingga penelitian ini selesai.

Daftar Pustaka

- [1] Syarif .Z., dan Sumoprastowo. 1985. *Ternak Perah*. CV. Yasaguna. Jakarta
- [2] Toelihere, M. R. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- [3] Djanuar. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buata pada sapi*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- [4] Hafez, E. S. E. 1987. *Reproduction in Farm Animal*, 4th Edition, Lea and Fibiger. Philadelphia, USA.
- [5] Zelpina E., Bayu R., dan Sumarsono T. 2012. *Kualitas Spermatozoa Post Thawing dari Semen Beku Sapi Perah*. Fakultas Peternakan Universitas Jambi. Jambi.
- [6] Deka, B.C. and Rao, A. R. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation of goat semen. *Indian Vet.J.* 64:591-594.
- [7] Pace, M.M, Sullivan, J.J., Elliot, F.I., Graham, E.F. and Coulter, G.H. 1981. Effect of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa fackaged in 0,5ml French straws. *J. Anim. Sci.* 53 (3) : 693-701.

- [8] Soepriondho, Y. 1985 . Pengaruh Waktu dan Suhu Thawing Semen Beku terhadap Angka Konsepsi pada Ternak Kerbau. Tesis. Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [9] Putri, H.P., Sumartono., Humaidah, N. 2019. Pengaruh Berbagai Suhu Thawing Terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi FH (Friesian Holstein). *Jurnal Rekastawa Peternakan*. Vol.2(1): 95-98
- [10] Zenichiro, K., Herliantien dan Sarastina. 2002. *Teknologi Prosessing Semen Beku pada Sapi*. Balai Inseminasi Buatan Singosari. Malang
- [11] Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. UB Press, Malang.
- [12] Syauqi,A. 2018. Comparative Study of References and Protein Quantifications Using Biuret-Spectrophotometric Method. *Chimica et Natura Acta*. Vol. 6 No. 2: 42-48. P-ISSN: 2355-0864 e-ISSN: 2541-2574.
- [13] Chandler, J.E., Ruiz, C. F., Adkinson, R.W. and Koonce, K. L. 1984. Relationship Between Final Temperature, Thaw Rate and Quality of Bovine Semen. *J. Dairy Sci*. 67 (8): 1806-1812
- [14] Bosrekar, M., Char, S. N., Patil, B. R. and Ranonekar, D. V.. 1984. Effect of Thawing Temperature and Time on The Forward Motility, Live Count and Acrosomal Maintenance Of Bovine Spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci*. 54 (12) : 1126-1130
- [15] Narato. 2009. Teknik Pengawetan dan Pewarnaan Sperma. Diakses pada tanggal 18 April 2020. URL:http://sma4rtzyoulyz.blogspot.com/2009_06_01_archive.html.
- [16] Hidayatin, D. 2002. *Kaji Banding Kualitas Semen Beku Produk BIBLembang dan Singosari pada Setiap Jalur Distribusi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [17] Ikhsan, M. N. 1992. *Manajemen Reproduksi ternak*. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang
- [18] Ansari M, Towhidil A, Moradi SM .2010. Effect Of Straw Size And Thawing Time On Quality Of Cryopreserved Buffalo Semen. *Reproductive Biology*.11(1)49-54.
- [19] Salim, M. A., Susilawati, T., dan Wahyuningsih, S. 2012. Pengaruh Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. Vol (12) No. 2: 14-19
- [20] Handiwirawan dan Fitri, Z. 1997. Penggunaan air kelapa sebagai penyeimbang fruktosa dalam pengencer terhadap kualitas sperma Sapi Simmental. Skripsi, Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara, Medan.