

**THE EFFECT OF VARIOUS THAWING TIME ON FROZEN SEMEN OF FAT  
TAILED SHEEP FOR VIABILITY, MOTILITY AND INTACT PLASMA  
MEMBRANE OF SPERMATOZOA**

**PENGARUH BERBAGAI WAKTU THAWING SEMEN BEKU DOMBA EKOR  
GEMUK(DEG) TERHADAP PERSENTASE VIABILITAS, MOTILITAS DAN  
MEMBRAN PLASMA UTUH SPERMATOZOA**

Wong Aihuwa Diah Lestari<sup>1)</sup>, Suherni Susilowati<sup>2)</sup>, Sunaryo Hadi Warsito<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Mahasiswa, <sup>2)</sup>Departemen Reproduksi Veteriner, <sup>3)</sup>Departemen Peternakan  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

**ABSTRACT**

The research was aimed to determine the effect and the best thawing time on frozen semen of fat-tailed sheep for viability, motility and intact plasma membrane spermatozoa. This research was conducted at the Teaching Farm Airlangga University, with type of research is true experiment in a Completely Randomized Design (CRD). Each group consisted of 3 treatments and 6 replication. The sample in this study were frozen semen of fat-tailed sheep. The sample criteria used was fat-tailed sheep among 4 years old male, with weight 50 kg. The independent variable in this study was the thawing time of the frozen semen of fat-tailed sheep containing thawing time P1 = 15 seconds, P2 = 30 seconds, P3 = 45 seconds. The dependent variable was the quality of fat-tailed sheep's spermatozoa. Then the data result processed using ANOVA oneway and continued with Honestly Significant Difference (HSD) test. Based on the result, it's indicated that the difference thawing time showed a tangible influence against ( $p < 0,05$ ) against the percentage of viability, motility and intact plasma membrane. Highest average percentage obtained by 52,5% for viability, 33,3% for motility and 44,5% for intact plasma membrane on P2 treatment and lowest percentage obtained from P1 treatment with 36,8% for viability, 17,5% for motility and 33,3% for intact plasma membrane.

**Key words :** Frozen Semen, Thawing, Viability, Motility, Intact Plasma Membrane

**Pendahuluan**

Salah satu cara untuk meningkatkan populasi domba di Indonesia dilakukan pemanfaatan teknologi reproduksi peternakan melalui teknik Inseminasi Buatan (IB) dengan menggunakan semen beku. Inseminasi buatan merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang digunakan dalam upaya meningkatkan populasi dan mutu genetik ternak. Penerapan IB pada ternak domba di Indonesia saat ini belum seefektif bila dibandingkan pada ternak sapi, masih terbatas dan masih dalam taraf uji coba sehingga hasilnya belum banyak dilaporkan. Tantangan dalam keberhasilan IB di lapangan adalah rendahnya kualitas semen beku yang digunakan.

Kualitas semen beku adalah salah satu faktor penentu keberhasilan program IB pada ternak, selain faktor kesuburan betina, ketrampilan inseminator dan pengetahuan zooteknis peternak. Spermatozoa mudah mengalami kerusakan selama proses krio-preservasi, sehingga menyebabkan kualitasnya menurun seperti motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa setelah *thawing* sehingga mempengaruhi pula tingkat fertilitasnya. *Thawing* dimaksudkan untuk mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan waktu tertentu sehingga dapat dideposisi ke alat reproduksi betina.

Waktu *thawing* semen beku yang tidak optimal akan menurunkan kualitas

spermatozoa. Oleh karena itu perlu diperhatikan waktu *thawing* yang optimal agar tingkat kematian yang tinggi setelah *thawing* melalui panas yang berlebihan dapat dihindarkan. Banyak pendapat tentang waktu *thawing* yang optimal untuk mendapatkan kualitas spermatozoa yang akan digunakan dalam pelaksanaan IB. Untuk itu perlu adanya penelitian tentang waktu *thawing* yang tepat agar kualitas semen memenuhi syarat untuk IB.

#### Metode Penelitian

##### Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Semen Beku Teaching Farm Universitas Airlangga di desa Tanjung Kecamatan Kedamean, Kabupaten Gresik. Penelitian ini dilaksanakan selama dua bulan, pada bulan Juli sampai dengan Agustus 2013.

##### Bahan dan Alat Penelitian

Penelitian ini menggunakan domba jantan berjumlah satu ekor, berumur 4 tahun, mempunyai berat badan 50 kg, secara klinis dinyatakan sehat.

Bahan-bahan penelitian meliputi : semen beku domba ekor gemuk, NaCl fisiologis, N<sub>2</sub> cair, larutan media HOS, alkohol 70% dan eosin-negrosin 2%.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *container* yang berisi nitrogen cair, penjepit semen beku (*pinset*), *beaker glass* 1000 ml, *thermometer*, *timer*, objek *glass*, *cover glass*, mikroskop Nikon, *counter*, pipet ukur, tabung mikro *centrifuge*, *incubator*, tabung reaksi.

#### Hasil dan Pembahasan

##### Viabilitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Setelah Pembekuan

Data persentase viabilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan dari tiga kelompok perlakuan dengan berbagai waktu *thawing* dan enam kali ulangan yang tercantum dalam tabel 1.

Menurut analisis statistik dengan menggunakan Anova terhadap rerata persentase viabilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan P1 berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) P2 dan P3, tetapi P2 tidak berbeda nyata dengan P3.

Pemeriksaan persentase spermatozoa hidup dan mati dari sediaan ulas yang menggunakan zat warna eosin dan negrosin. Spermatozoa yang tidak menyerap zat warna eosin negrosin menyatakan jumlah yang hidup dan spermatozoa yang mati permeabilitas membran sel nya meningkat sehingga akan menyerap warna eosin negrosin. Spermatozoa yang hidup mempunyai kondisi membran baik sehingga zat warna kesulitan dalam menembus membran, akibatnya spermatozoa tetap berwarna jernih (Susilowati dkk, 2010).

Pada tabel 2. hasil pengamatan persentase viabilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan menunjukkan bahwa P2 (*thawing* pada suhu 25°C selama 30 detik) memberikan hasil terbaik yaitu sebesar 52,5% dibandingkan dengan P1 (*thawing* pada suhu 25°C selama 15 detik) dan P3 (*thawing* pada suhu 25°C selama 45 detik) yang masing-masing adalah 36,8% dan 49,4%.

P1 menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa terendah (36,8%). Hal ini dikarenakan suhu yang rendah dan waktu yang terlalu singkat akan mengakibatkan bocornya substansi vital dalam spermatozoa sehingga enzim intraseluler, lipoprotein, ATP, kalium intraseluler dan lemak

Tabel 1. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Setelah Pembekuan

Perlakuan	Viabilitas Spermatozoa (%) (Rerata ± Standar Deviasi)
P1	36,8 <sup>a</sup> ± 4,032
P2	52,5 <sup>b</sup> ± 4,736
P3	49,4 <sup>b</sup> ± 5,717

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

P1 (15 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25°C selama 15 detik.

P2 (30 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25°C selama 30 detik.

P3 (45 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25°C selama 45 detik.

berkurang dan menyebabkan kerusakan membran plasma sehingga presentase viabilitas rendah (Yudhaningsih, 2004).

P2 menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa tertinggi (52,5%) karena waktu *thawing* 30 detik belum menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas metabolisme yang berakibat menurunnya viabilitas spermatozoa dan diduga kondisi ini ideal untuk kehidupan sel spermatozoa.

P3 menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa lebih rendah (49,4%) dari P2 (52,5%) karena waktu *thawing* dibuat lebih lama dari semua perlakuan. Kondisi ini menyebabkan *cold shock* dan rusaknya dinding sitoplasma spermatozoa dan mengakibatkan spermatozoa mati. Menurut witasra (2001), menyatakan bahwa semakin lama waktu *thawing* maka tingkat kematian spermatozoa akan meningkat.

#### Motilitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Setelah Pembekuan

Data persentase motilitas progresif spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan dari tiga kelompok perlakuan dengan berbagai waktu *thawing* dan enam kali ulangan yang tercantum dalam Tabel 2.

Berdasarkan analisis statistik dengan menggunakan Anova terhadap rerata persentase motilitas progresif spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ ) antara ketiga kelompok tersebut karena memiliki perbedaan waktu *thawing* diantara masing-masing perlakuan.

Motilitas spermatozoa merupakan kemampuan gerak maju progresif spermatozoa, yang merupakan salah satu indikasi dalam menentukan kualitas spermatozoa.

Daya gerak sangat dibutuhkan spermatozoa untuk mencapai tempat pembuahan saat menembus lapisan pelindung sel telur.

Rerata persentase motilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan pada hasil pengamatan menunjukkan hasil yang bervariasi. Diketahui bahwa *thawing* pada suhu 25° C selama 30 detik (P2) mempunyai motilitas yang terbaik yaitu sebesar 33,3% dibandingkan dengan *thawing* pada suhu 25° C selama 15 detik (P1) yang hanya mempunyai motilitas sebesar 17,5% dan *thawing* pada suhu 25° C selama 45 detik (P3) yang mempunyai motilitas sebesar 23,3%.

Persentase motilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan dengan suhu *thawing* 25° C selama 30 detik (P2) menunjukkan bahwa spermatozoa domba ekor gemuk tersebut masih layak untuk dipakai dalam Inseminasi buatan karena sudah memenuhi ketentuan. Menurut Dirjenak (2000), motilitas spermatozoa domba setelah pembekuan minimal 30% dengan gerakan kecepatan individu spermatozoa 2 (sedang).

P1 menunjukkan bahwa persentase motilitasnya terendah (17,5%) karena waktu *thawing* yang dibuat sangat singkat menyebabkan kristal-kristal es belum mencair secara sempurna sehingga menghambat pergerakan spermatozoa secara progresif (Sari, 2008).

P2 menunjukkan bahwa persentase motilitasnya paling tinggi (33,3%) diantara semua perlakuan karena waktu *thawing* yang tidak terlalu cepat dan tidak terlalu lama memberikan kondisi yang ideal bagi aktifitas motilitas spermatozoa.

Tabel 2. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Setelah Pembekuan

Perlakuan	Motilitas Spermatozoa (%) (Rerata ± Standar Deviasi)
P1	17,5 <sup>a</sup> ± 2,738
P2	33,3 <sup>c</sup> ± 2,581
P3	23,3 <sup>b</sup> ± 2,581

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

P1 (15 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25° C selama 15 detik.

P2 (30 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25° C selama 30 detik.

P3 (45 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25° C selama 45 detik.

Tabel 3. Rerata dan Standar Deviasi Persentase Membran Plasma Uterus Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Setelah Pembekuan.

Perlakuan	Membran Plasma Uterus Spermatozoa (%) (Rerata ± Standar Deviasi)
P1	33,3 <sup>a</sup> ± 4,053
P2	44,5 <sup>b</sup> ± 3,158
P3	41,7 <sup>b</sup> ± 2,179

Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

P1 (15 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25°C selama 15 detik.

P2 (30 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25°C selama 30 detik.

P3 (45 detik) : Semen beku di *Thawing* pada suhu 25°C selama 45 detik.

P3 menunjukkan bahwa persentase motilitasnya lebih rendah (23,3%) dari P2 (33,3%). Penyebab rendahnya kualitas semen beku adalah terjadinya peroksidasi lipid (Waluyo, 2006).

Menurut Talib *et al* (2001), kerusakan spermatozoa juga dipengaruhi oleh 2 faktor fisik yaitu formasi kristal es yang merusak spermatozoa dan peningkatan jumlah air murni yang dikeluarkan oleh kristal es.

#### Membran Plasma Uterus Spermatozoa Domba Ekor Gemuk Setelah Pembekuan

Data persentase membran plasma uterus spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan dari tiga kelompok perlakuan dengan berbagai waktu *thawing* dan enam kali ulangan yang tercantum dalam Tabel 3.

Menurut analisis data statistik dengan menggunakan Anova terhadap rerata persentase membran plasma uterus spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan P1 berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan P2, tetapi P2 tidak berbeda nyata dengan P3.

Membran plasma uterus spermatozoa adalah suatu keadaan yang menunjukkan fungsi fisiologis membran yang terjaga sebagai kontrol terhadap transport air sehingga cairan diluar sel tidak dapat memasuki sel (Rozi, 2004).

Pada Tabel 4.3 menunjukkan bahwa pada *thawing* pada suhu 25°C selama 30 detik (P2) memiliki nilai tertinggi dibandingkan dengan *thawing* selama 15 dan 45 detik (P3) yaitu sebesar 44,5%. Penurunan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa terjadi karena adanya kerusakan membran spermatozoa. Permukaan spermatozoa dilapisi suatu membran lipoprotein yang berfungsi melindungi organel dalam sel dan sebagai filter bagi pertukaran zat baik intra seluler maupun ekstraseluler.

Menurut Lechniak *et al* (2002) bahwa, ketidakstabilan membran dan konsentrasi ion intraseluler akan mempengaruhi keutuhan membran.

Kerusakan membran mengakibatkan terjadinya ketidakstabilan penyerapan cairan saat spermatozoa diletakkan pada medium dengan tekanan osmose rendah. HOS test yang memiliki tekanan osmose rendah mudah masuk kedalam tubuh spermatozoa yang memiliki tekanan osmose lebih tinggi. Bila kondisi membran baik, cairan didalam sel tidak dapat keluar kembali sehingga ekor spermatozoa bengkok dan melingkar (Sari, 2008).

Keutuhan membran plasma menentukan hidup dan matinya spermatozoa sehingga persentase membran plasma uterus tidak berbeda jauh dengan persentase viabilitas spermatozoa. Sebaliknya, persentase viabilitas spermatozoa lebih tinggi daripada persentase motilitas spermatozoa, karena tidak semua spermatozoa yang hidup dapat bergerak progresif, melainkan sebagian hanya bergerak ditempat, berputar-putar atau maju-mundur (Rizal dan Herdis 2008).

Persentase viabilitas spermatozoa lebih tinggi daripada motilitas spermatozoa, hal ini dikarenakan spermatozoa yang hidup belum tentu bergerak, namun spermatozoa yang tidak bergerak teradang masih hidup (Campbell *et al*, 2003).

#### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa : 1. Persentase tertinggi viabilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan dengan waktu *thawing* 30 detik pada suhu 25°C adalah sebesar 52,5%. 2. Persentase tertinggi motilitas spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan

dengan waktu *thawing* 30 detik pada suhu 25°C adalah sebesar 33,3%. 3. Persentase tertinggi membran plasma utuh spermatozoa domba ekor gemuk setelah pembekuan dengan waktu *thawing* 30 detik pada suhu 25°C adalah sebesar 44,5%.

#### Daftar Pustaka

- Campbell, J. R., K. L. Campbell and M. D. Kenealy. 2003. Artificial Insemination. In: Anim. Sci. 4<sup>th</sup> Ed. Mc. Graw-Hill. New York.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2000. Prosedur Tetap (PROTAP) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta. p:40-47.
- Lechniak, M. Sabrani and W Farstad. 2002. Effect of Thaw Rates on Survival of Buffalo Spermatozoa Frozen In Straws. *Journal of Dairy Science.*, 67: 1523-1538.
- Rizal, M. dan Herdis 2008. Inseminasi Buatan Pada Domba. Penerbit Rineka Citra. Bandung.
- Rozi, B. 2004. Motilitas Spermatozoa Sapi Madura Pada Suhu dan Interval Waktu yang Berbeda dan Hubungan Antara Motilitas Dengan Viabilitas, Abnormalitas dan Integritas Membran [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilowati, S., Hardijanto., T.W. Suprayogi T. Sardjito, dan T. Hernawati. 2010. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Airlangga University Press.
- Yudhaningsih, H. 2004. Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Madura Menggunakan Pengencer yang Berbeda Dalam Proses Pembekuan Semen [Skripsi]. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.