

## **Pengaruh Suhu *Thawing* pada Kualitas Spermatozoa Sapi Pejantan *Friesian Holstein***

### **The Effect of Thawing Temperature on Sperm Quality of Friesian Holstein Bulls**

**Tri Utami<sup>1</sup>, Tarsisius Considus Tophianong<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan,  
Universitas Nusa Cendana, Kupang, NTT  
Email : tamya\_trico@yahoo.co.id

#### **Abstract**

The percentage of sperm motility and morphology are important criteria in evaluating the quality of sperm before it is used for artificial insemination (AI). This study was conducted to observe post thawing motility and abnormal morphology of spermatozoa Friesian Holstein (FH). The materials were used 10 straws of FH bulls in the form of 0.25 ml. A total of 10 straws then divided into two treatment groups of thawing in water at 37°C and water 8°C, respectively. An examination of the motility and morphology of spermatozoa abnormalities performed every two hours for two times. Calculating the percentage of sperm motility was done by calculating the percentage of spermatozoa moving forward in the field of view under a microscope with a magnification of 10x. The percentage of abnormal spermatozoa was assessed by William's stain. Spermatozoa morphology was observed by using a microscope magnification of 100x. Abnormalities of spermatozoa were calculated from a total of 200 spermatozoa, either normal or abnormal. At the same thawing time, the motility of FH cattle sperms post thawing in water temperature 37°C had a higher preference than that of post thawing in water temperature 8°C, although it was not significantly different ( $P > 0.05$ ). Based on morphological aspects, frozen semen used in this study is within the tolerance limit for the total percentage of abnormal sperm morphology between 12% to 23% and normal morphology between 70% to 88%.

**Key words:** Quality of spermatozoa, Friesian Holstein, thawing, morphology, motility

#### **Abstrak**

Persentase motilitas dan morfologi spermatozoa merupakan kriteria penting pada evaluasi kualitas sperma sebelum digunakan untuk inseminasi buatan (IB). Penelitian ini dilakukan untuk melihat motilitas dan morfologi abnormal spermatozoa sapi pejantan *Friesian Holstein* (FH) setelah *thawing*. Bahan yang digunakan adalah 10 *straw* sapi FH dalam ukuran 0,25 ml. Sepuluh *straw* kemudian dibagi menjadi dua kelompok perlakuan *thawing*, yakni dithawing dalam air 37°C dan dalam air 8°C. Pemeriksaan terhadap motilitas dan abnormalitas morfologi spermatozoa dilakukan setiap dua jam sekali sebanyak dua kali. Penghitungan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang bergerak maju dalam satu bidang pandang dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x. Penilaian persentase abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan *William's stain*. Pengamatan morfologi spermatozoa digunakan mikroskop perbesaran 100x. Abnormalitas spermatozoa dihitung dari total 200 spermatozoa yang normal maupun abnormal. Pada lama waktu *thawing* yang sama, motilitas spermatozoa pada semen beku sapi FH yang di-*thawing* dalam air 37°C memiliki kecenderungan lebih tinggi jika dibandingkan dengan *thawing* dalam air 8°C, meskipun secara statistik tidak berbeda signifikan ( $P > 0.05$ ). Berdasar aspek morfologi, semen beku sapi FH yang digunakan dalam penelitian ini berada dalam batas toleransi karena memiliki persentase total morfologi spermatozoa abnormal 12% -23% dan morfologi normal 70%-88%.

**Kata kunci:** Kualitas spermatozoa, *Friesian Holstein*, *thawing*, morfologi, motilitas

## Pendahuluan

Sistem manajemen peternakan sapi perah di Indonesia pada umumnya masih bersifat tradisional dan dalam pengelolaannya masih kurang efisien (Prihatno *et al.*, 2012). Program Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu teknologi reproduksi yang banyak dipilih peternak terutama dalam manajemen pembibitan sapi perah *Friesian Holstein* (FH) karena dapat meningkatkan potensi genetik (Vilakazi and Webb., 2004) dan membantu meningkatkan angka kebuntingan sapi (Said *et al.*, 2005). Peningkatan mutu genetik dan angka kebuntingan diharapkan dapat meningkatkan efisiensi dan produktivitas sapi perah.

Keberhasilan IB ditunjang oleh beberapa faktor, salah satu faktor yang berperan adalah kualitas semen yang digunakan untuk IB. Semen yang dipersiapkan untuk pelaksanaan IB harus mengandung jumlah spermatozoa yang cukup dan fertilitas yang memadai. Pengujian terhadap fertilitas merupakan tahapan akhir dari rangkaian pengujian kualitas spermatozoa. Untuk menentukan spermatozoa layak untuk IB, kualitas spermatozoa diperiksa dengan berbagai metode, antara lain: persentase motilitas, daya hidup, intak akrosom dan morfologi normal (De Jonge, 1999; Ostermeier *et al.*, 2000; Foote, 2002). Morfologi spermatozoa digunakan sebagai salah satu kriteria penting dalam evaluasi kualitas semen (Vilakazi and Webb, 2004).

Berdasar metode tersebut, persentase motilitas dan morfologi spermatozoa merupakan kriteria penting pada evaluasi kualitas sperma sebelum digunakan untuk IB. Motilitas dan morfologi spermatozoa merupakan sebagian faktor yang menentukan keberhasilan fertilisasi. Jika kualitas

dari ejakulat tidak diperiksa secara benar, maka kerugian ekonomi dapat timbul baik pada pengaturan maupun prosedur pelaksanaan IB (Ostermeier *et al.*, 2000).

Pada sebagian besar studi, abnormalitas spermatozoa dikaitkan dengan fertilitas (Senger, 2003), infertilitas dan sterilitas pejantan (Chenoweth, 2005). Penggolongan abnormalitas spermatozoa secara tradisional berdasarkan bagian (kepala, ekor, *midpiece* dan *cytoplasmic droplet*) dan asal kelainan itu terjadi. Abnormalitas atau defek primer berasal dari proses spermatogenesis dalam testis, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi akibat kelainan dalam epididimis (Parkinson, 2004; Barth, 2007). Abnormalitas tersier berasal dari kelenjar asesoria atau setelah ejakulasi (Parkinson, 2004). Defek atau kerusakan struktur spermatozoa dapat disebabkan oleh faktor lingkungan, genetik, atau kombinasi keduanya (Chenoweth, 2005).

Penilaian motilitas dan morfologi spermatozoa dapat dilakukan segera sesudah koleksi semen atau *post thawing* pada semen beku sebelum IB. Bervariasinya kualitas semen beku *post thawing* pada berbagai bangsa sapi menunjukkan belum adanya suatu teknik yang dapat memberikan hasil optimum tercapainya fertilisasi dengan semen beku sapi (Salim *et al.*, 2012). Penggunaan air bersuhu 37°C dan 8°C sebagai media *thawing* pada penelitian ini merupakan upaya untuk mengetahui teknik *thawing* yang memberikan hasil optimum kualitas spermatozoa semen beku sapi FH.

## Materi dan Metode

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bagian Reproduksi dan Obstetri Fakultas

Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Bahan yang digunakan adalah 10 semen beku dari sapi FH dalam bentuk *straw* 0,25 cc yang diperoleh dari sebuah instansi di Yogyakarta. Bahan lain yang digunakan adalah air bertemperatur 37°C dan 8 °C, N<sub>2</sub> cair, spiritus, alkohol 95 %, larutan *chloramin* 0.5 %, pewarna *eosin-nigrosin* dan *carbofuchsin-eosin*. Sebanyak 10 *straw* semen beku sapi FH kemudian dibagi menjadi dua kelompok perlakuan *thawing*, yakni 5 *straw di-thawing* dalam air 37°C dan 5 *straw* lainnya *di-thawing* dalam air 8°C.

Pemeriksaan terhadap motilitas dan abnormalitas morfologi spermatozoa dilakukan setiap dua jam sekali sebanyak dua kali. Penilaian persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil beberapa tetes semen dengan pipet tetes, diteteskan di atas gelas obyek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x. Penghitungan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang bergerak maju dalam satu bidang pandang (Hafez *et al.*, 2000). Penghitungan dilakukan sebanyak dua kali, kemudian diambil rata-ratanya. Analisa data yang digunakan pada penilaian persentase motilitas spermatozoa yaitu menggunakan uji t.

Pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan dengan metode *William's stain* (Hafez *et al.*, 2000). Apusan semen segar dibuat dengan menggunakan satu tetes semen diletakkan di atas gelas obyek, kemudian dengan menggunakan gelas obyek lain dengan membentuk sudut tumpul, semen disebarkan, diangin-anginkan supaya kering dan difiksasi menggunakan api, kemudian dicelupkan ke dalam alkohol absolut selama 3-4 menit, selanjutnya diangkat dan dibiarkan kering. Slide yang telah kering dimasukkan ke dalam larutan *chloramin* 0,5 % selama  $\pm$  2 menit sampai mukusnya hilang dan apusan semen terlihat tampak bersih. Slide dicuci dengan aquades kemudian dengan alkohol 95 %, lalu diwarnai *carbofuchsin-eosin* selama  $\pm$  10 menit, dicuci air, dikeringkan dan kemudian dilakukan pengamatan terhadap *spermatozoa* dengan mikroskop perbesaran 100x. Abnormalitas spermatozoa dihitung dari total 200 spermatozoa yang normal maupun abnormal, dan kemudian dilakukan analisis secara deskriptif.

### Hasil dan Pembahasan

Perhitungan rerata motilitas spermatozoa semen beku sapi FH setelah *di-thawing* dalam air bersuhu 37°C dan 8°C yang diperiksa setiap dua jam selama dua kali, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rerata motilitas spermatozoa semen beku sapi FH setelah *di-thawing* dalam air bersuhu 37°C dan 8°C pada interval waktu dua jam.

Jam ke	Friesian Holstein (N = 10)	
	Air 37°C	Air 8°C
	Rerata (%)	Rerata (%)
1	39.23 $\pm$ 0 .00	34.41 $\pm$ 2.69
2	27.25 $\pm$ 1.54	26.56 $\pm$ 3.37

Hasil penelitian ini menunjukkan, bahwa motilitas spermatozoa sapi FH setelah di-*thawing* dalam air suhu 37°C maupun 8°C pada lama waktu *thawing* yang sama tidak terdapat perbedaan yang signifikan ( $P > 0.05$ ). Semen beku setelah *thawing* dalam air 37°C memiliki kecenderungan menghasilkan motilitas yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan dalam air 8°C, meskipun secara analisis statistik tidak berbeda signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa bila suhu *thawing* semakin rendah dan durasi *thawing* panjang menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Selain itu, suhu *thawing* 37°C yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan suhu ideal bagi aktivitas spermatozoa, sehingga sperma motil terlihat lebih tinggi persentasenya.

Hasil penelitian ini diperkuat oleh pendapat Senger (2003) yang menyatakan, bahwa teknik pemeriksaan motilitas spermatozoa yang sederhana dan paling banyak digunakan yaitu pemeriksaan pada suhu 37°C, karena menghasilkan motilitas spermatozoa yang lebih baik jika dibandingkan dengan pemeriksaan dibawah suhu 37°C. Gordon (2002) menambahkan, bahwa suhu *thawing* yang menghasilkan nilai motilitas dan viabilitas spermatozoa *post thawing* optimum adalah 30°C–37°C selama 30 detik. Al-Badry (2012) dalam penelitiannya melaporkan, bahwa *thawing* semen beku di dalam air 5°C menunjukkan hasil yang berbeda signifikan terhadap *thawing* didalam air bersuhu 37°C dan 60°C. Semen beku yang di-*thawing* dalam air 5°C menghasilkan motilitas yang lebih rendah jika dibandingkan dengan *thawing* dengan air bersuhu 37°C maupun 60°C. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Salim *et al.*

(2012) yang menggunakan semen beku dari tiga bangsa sapi, yaitu: sapi Bali, Madura dan PO serta digunakan tiga perlakuan suhu *thawing* yang berbeda, yakni: 5°C, 15°C dan 37°C. Dari penelitian tersebut dilaporkan persentase motilitas terbaik yaitu pada perlakuan dengan suhu 37°C.

Saat pembekuan dan *thawing* semen, terjadi peristiwa tekanan osmotik pada spermatozoa sehingga menyebabkan konfigurasi lipid protein membran spermatozoa menjadi tidak seimbang kemudian mempengaruhi keseimbangan osmotik. Selanjutnya, terlihat penurunan motilitas pada perlakuan dengan suhu 5°C dan 15°C (Salim *et al.*, 2012). Durasi *thawing* yang terlalu lama menyebabkan aktivitas metabolisme meningkat dan berlangsung secara massal, sehingga terjadi peningkatan produksi asam laktat akibatnya konsentrasi asam laktat yang bersifat toksik meningkat dan berakibat pada rendahnya daya gerak spermatozoa sehingga terjadi kematian (Watson, 1996)

Menurut Senger (2003) produksi spermatozoa yang berlangsung dalam tubulus seminiferus mencapai 20 milyar per hari (lebih dari 200.000 per detik). Dalam proses tersebut memiliki peluang terjadinya kesalahan. Kesalahan ini diekspresikan sebagai spermatozoa abnormal. Persentase abnormalitas spermatozoa semen beku sapi FH yang di-*thawing* dalam air 37°C dan 8°C dapat dilihat pada Tabel 2. Data pada Tabel 2 ini merupakan hasil perhitungan rata-rata persentase morfologi spermatozoa, yaitu: morfologi normal maupun abnormal yang diamati saat pemeriksaan semen.

Tabel 2. Rerata persentase morfologi spermatozoa semen beku sapi *Friesian Holstein* yang *di-thawing* dalam air 37°C dan 8°C selama interval waktu 2 jam

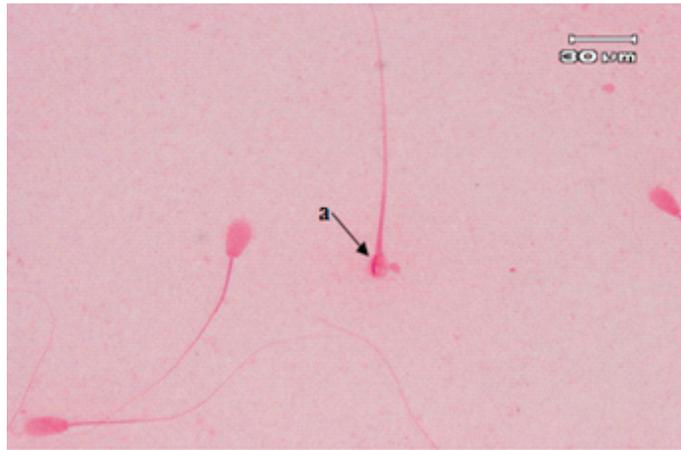
Pasca <i>thawing</i> ( Jam ke → )	Air 37° C		Air 8°C	
	0	2	0	2
Normal (%)	88	77	86	80
Abnormalitas kepala (%)	2	6	6	8
Abnormalitas ekor (%)	10	17	8	12

Persentase morfologi spermatozoa normal pada semen beku sapi FH setelah *thawing* dalam air bersuhu 37°C dan 8°C dengan lama waktu yang bervariasi (1–2 jam) menunjukkan nilai persentase morfologi normal antara 77% hingga 88% (Tabel 2). Nilai persentase total spermatozoa abnormal tertinggi pada penelitian ini yaitu semen yang *di thawing* didalam air suhu 8°C sebesar 20 % dan semen yang *di-thawing* dalam air suhu 37°C sebesar 23 %. Barth (2007) melaporkan, bahwa secara umum defek kepala (*nuclear*) yang berkisar antara 15 % –20 % dan defek akrosom, serta ekor spermatozoa hingga 25 % masih dalam batas toleransi. Berdasarkan pada pendapat Bath (2007) tersebut, dapat diketahui bahwa persentase total spermatozoa abnormal pada semen yang digunakan dalam penelitian ini masih dalam batas toleransi.

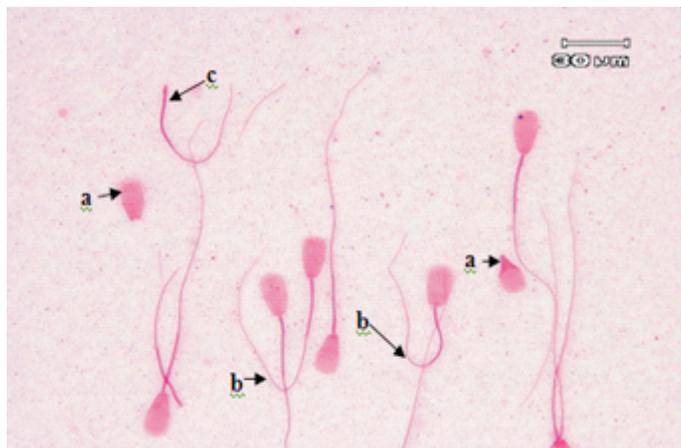
Abnormalitas morfologi spermatozoa dapat terjadi secara primer, sekunder atau tersier. Abnormalitas primer terjadi pada proses spermatogenesis dalam testis, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi selama perjalanan spermatozoa di epididimis (Hafez *et al.*, 2000; Parkinson, 2004). Kerusakan spermatozoa juga

disebabkan selama atau setelah ejakulasi atau dari penanganan yang salah saat IB yang disebut sebagai abnormalitas spermatozoa tersier (Hafez *et al.*, 2000).

Bentuk-bentuk abnormalitas spermatozoa primer, antara lain kepala yang terlampau kecil (*microcephalic*) atau terlalu besar (*macrocephalic*), kepala yang lebar, memanjang, berganda dan berbentuk seperti buah per (*pyriformis*), badan atau ekor berganda; pembesaran bagian tengah; ekor atau bagian tengah yang melingkar (*tail coiled*), dan pertautan abaksial (Hafez *et al.*, 2000). Salah satu bentuk dari abnormalitas primer yang teramati pada saat penelitian, yaitu: *microcephalic* (Gambar 1). Bentuk-bentuk abnormalitas sekunder yang teramati pada saat penelitian antara lain: *bent tail* (Gambar 2), dan *proximal droplet* dan *simple bent tail* (Gambar 3). Bentuk abnormalitas primer dan sekunder yang ditemukan dalam penelitian ini merupakan pengaruh proses spermatogenesis di dalam testis dan kelainan yang terjadi dalam epididimis, bukan akibat pengaruh perlakuan *thawing*.



Gambar 1. *Microcephalic spermatozoa* (a) merupakan salah satu bentuk morfologi abnormalitas primer spermatozoa yang teramati (Perbesaran 100x.).



Gambar 2. Morfologi abnormalitas sekunder dan tersier spermatozoa; *lose head* (a), *bent tail* (b), *lose tail* (c) (Perbesaran 100x.).



Gambar 3. Morfologi abnormalitas sekunder spermatozoa; *Proximal droplet* (a), *simple bent tail* (b) (Perbesaran 100x.).

Menurut Salim *et al.* (2012) salah satu ciri spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier yaitu ekor terputus (Gambar 2.c) maupun kepala terputus (Gambar 2.a). Abnormalitas spermatozoa ini dapat terjadi kemungkinan akibat pengaruh perlakuan *thawing* maupun proses preparasi.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diuraikan, dapat disimpulkan bahwa motilitas spermatozoa pada semen beku sapi FH setelah *thawing* dalam air suhu 37°C memiliki kecenderungan lebih tinggi jika dibandingkan dengan setelah *thawing* dalam air suhu 8°C, meskipun secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Namun demikian, hasil penelitian ini terdapat perbedaan dengan teori maupun hasil penelitian mengenai metabolisme maupun motilitas spermatozoa sebelumnya, sehingga perlu studi lebih lanjut dengan menggunakan variasi suhu yang lebih baik dan analisis yang lebih mendalam. Ditinjau dari pengamatan morfologi spermatozoa, semen beku sapi FH yang digunakan dalam penelitian ini memiliki persentase total spermatozoa normal antara 77% hingga 88% dan persentase morfologi spermatozoa abnormal antara 12% hingga 23%. Kisaran persentase morfologi spermatozoa abnormal tersebut masih dalam batas toleransi. Abnormalitas morfologi spermatozoa yang dijumpai pada penelitian ini meliputi abnormalitas primer, sekunder dan tersier.

### Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ketua Bagian Reproduksi dan Obstetri, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada,

Yogyakarta yang telah memberikan ijin dan mendukung pelaksanaan penelitian.

### Daftar Pustaka

- Al-Badry, K.I. (2012) Effect of Various Thawing Times and Temperatures on Frozen Semen Quality of Friesian Bulls in Iraq. *Int. J. Anim. Veter. Adv.* 4: 384-388.
- Barth, A.D. (2007) Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. In : Current Therapy in Large Animal Theriogenology. 2<sup>nd</sup> Ed. Saunders, Elsevier, Inc. Philadelphia.
- Chenoweth, P.J. (2005) Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64: 457-468.
- De Jonge, C. (1999) Attributes of fertile spermatozoa: Andrology lab corner an update. *J. Andrology.* 20: 463-473.
- Foote, R.H. (2002) The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Am. Soc. J. Anim. Sci.* 80: 1-10.
- Gordon, I. (2002) Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hafez, B., Bellin, M.E., Varner, D.D., Love, C.C., Lenz, R.W., Didion, B.A., Dally, M. and Ax, R.L. (2000) Semen Evaluation. In Reproduction in Farm Animals. 7<sup>th</sup> Ed. Lea dan febiger. Philadelphia, USA.
- Hafez, E.S.E and Garner, D.L. (2000) *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In Reproduction in Farm Animals. 7<sup>th</sup> Ed. Lea dan febiger. Philadelphia.
- Ostermeier, G.C., Sartor-Bergfelt R., Susko-Parrish, J.L. and Parrish, J.J. (2000) Review: Bull fertility and sperm nuclear shape. *Ag. Biotech. Net.* 2: 1-6.
- Prihatno, S.A., Kusumawati, A., Karja, N.W.K. dan Sumiarto, B. (2012) Kajian Kawin Berulang Sapi Perah pada Tingkat Peternak. *J. Sain Vet.* 30: 107-117.

- Parkinson T.J. (2004) Review: Evaluation of Fertility and Infertility in natural service bulls. *Vet. J.* 168: 215–229.
- Salim, M.A., Susilawati, T. dan Wahyuningsih, S. (2012) Pengaruh Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet.* 12: 14–19.
- Said, S., Gunawan, M., Kaiin, E.M. dan Tappa B. (2005) Daya Tahan Hidup Sperma Cair Sapi Simmental yang Disimpan dalam *Straw* pada Temperatur 5°C. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Senger, P.L. (2003) Endocrinology of the Male and Spermatogenesis. In: Pathways to Pregnancy and Parturition. Current Conceptions, Inc., Pullman. Washington. USA.
- Vilakazi, D.M. and Webb, E.C. (2004) Effect of Age and Season on Sperm Morphology of Friesland Bulls at an Artificial Insemination Centre in South Africa. *South Afric. J. Anim Sci.:* 34: 62–69.
- Watson, P.F. (1996) Cooling of Spermatozoa and Freezing Capacity. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 135–140.