

## Pengaruh Perbedaan Level Krioprotektan DMA terhadap Pembekuan Sperma Ayam

Yosephine Laura Raynardia E. N.

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Tidar Magelang

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui level DMA yang paling efektif untuk pembekuan sperma ayam. Penelitian ini menggunakan 4 ekor pejantan ayam Bangkok berumur 12 sampai 18 bulan sebagai sumber sperma. Sperma dari 4 ekor pejantan ditampung setiap tujuh hari sekali dan dibekukan dalam kontainer nitrogen cair  $-196^{\circ}\text{C}$  dengan menggunakan krioprotektan DMA dengan konsentrasi 10% (P1), 14% (P2), dan 18% (P3). *Thawing* menggunakan air es dengan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas sperma turun setelah pembekuan yang terlihat pada motilitas akhir pada P1, P2, dan P3 berturut-turut adalah  $15\pm 5\%$ ,  $7,24\pm 2,54\%$ , dan  $0\%$ ; viabilitas  $22\pm 4,43\%$ ,  $0\%$ , dan  $0\%$ ; serta abnormalitas  $67,2\pm 4,09\%$ ,  $75,2\pm 19,38\%$ ,  $61,8\pm 22,55\%$ . Kesimpulan yang diperoleh adalah konsentrasi krioprotektan DMA pada level 10% memperlihatkan penurunan yang besar pada kualitas sperma, sebaiknya konsentrasi DMA yang digunakan di bawah 10%.

**Kata kunci:** DMA, Pembekuan sperma, Kualitas sperma

### Abstract

The objective of this study was to determine the most effective DMA level in frozen sperm chickens. Sperm was collected from 4 roosters native chicken (Bangkok) aged 12 to 18 months for sperm donors. Sperm was collected once a week and cryopreserved 24 h in liquid nitrogen containers  $-196^{\circ}\text{C}$  with Dimethylacetamide (DMA) concentration 10% (P1), 14% (P2), and 18% (P3). Frozen thawed sperm quality was observed after thawing at  $4^{\circ}\text{C}$  60s. The results showed that sperm quality decreased while freezing process. Motility P1, P2, and P3 after thawed were  $15\pm 5\%$ ,  $7,24\pm 2,54\%$ , dan  $0\%$  respectively; viability  $22\pm 4,43\%$ ,  $0\%$ , dan  $0\%$  respectively; and abnormality  $67,2\pm 4,09\%$ ,  $75,2\pm 19,38\%$ ,  $61,8\pm 22,55\%$  respectively. The conclusion is usage of DMA as cryoprotectant on 10% concentration showed a great decrease on sperm quality. Usage of DMA as cryoprotectant is better than below 10% in freezing sperm.

**Keywords:** DMA, Frozen thawed chicken sperm, Sperm quality

### Pendahuluan

Karakteristik sperma ayam berbeda dengan sperma sapi, yaitu memiliki ejakulat yang sedikit dengan konsentrasi *spermato-zoa* yang tinggi, sehingga sperma ayam untuk diolah menjadi produk komersil seperti sperma beku. Sperma beku menggunakan krioprotektan sebagai zat pelindung dinding *spermatozoa* saat pembekuan. Krioprotektan berfungsi untuk melindungi

dari keadaan *cold shock* dan kerusakan sel akibat terbentuknya kristal es. Krioprotektan *dimethylacetamide* (DMA) adalah krio-protektan yang memberikan kualitas baik pada sperma ayam setelah *thawing*. Pemanfaatan DMA dalam dunia industri adalah sebagai zat tambahan yang digunakan dalam sintesis membran.

Level penambahan DMA masih sangat bervariasi, namun level 6% adalah yang paling umum digunakan (Partyka *et al.*, 2010). Level penambahan DMA

berbeda pada setiap jenis unggas karena sifat membran *spermatozoa* yang berbeda pada setiap jenis unggas. Ayam memiliki membran sel sperma yang lebih elastis dibanding jenis unggas lain, hal ini berkaitan dengan komponen fosfolipid di dalamnya (Seigneurin *et al.*, 2013). Studi tentang pengaruh krioprotektan DMA terhadap pembekuan sperma masih sedikit dilakukan, oleh karena itu dilaksanakan penelitian mengenai pengaruh perbedaan level krioprotektan DMA pada pembekuan sperma ayam Bangkok.

### **Materi dan Metode**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada selama 3 bulan, mulai dari bulan Maret sampai bulan Mei 2015.

#### **Materi**

**Ternak.** Materi ternak yang digunakan adalah ayam keturunan Bangkok jantan dari peternakan rakyat khusus ayam keturunan Bangkok di kecamatan Semin, Kabupaten Gunung Kidul dan peternakan rakyat khusus ayam aduan di Kabupaten Bantul yang seluruhnya berjumlah 4 ekor yang berumur sekitar 1 tahun sebagai sumber sperma. Ayam kampung betina fase produksi berjumlah 30 ekor yang berasal dari peternakan rakyat di Kabupaten Sleman. Ayam jantan diberi pakan AD2 yang diproduksi oleh PT. Japfa Comfeed. Pakan pejantan diberikan

sebanyak 100 gr/ekor/hari. Ayam kampung betina diberi pakan campuran dari jagung menir, bekatul, dan konsentrat ayam petelur PT.Japfa Comfeed dengan perbandingan 4:3:3 secara *ad libitum*. Pemberian air minum diberikan secara *ad libitum*.

**Alat.** Materi alat yang digunakan untuk penampungan sperma, pemeriksaan sperma, dan proses pembekuan sperma adalah sebagai berikut: tabung penampung sperma, termos tempat tabung sperma, *aluminium foil*, rak gabus tabung sperma, dan pipet; alat ini digunakan saat menampung sperma. Alat yang digunakan untuk pemeriksaan sperma antara lain mikroskop merk Nikon tipe 120 buatan Jepang, kaca objek, gelas ukur, kertas pH merk Universal, mikropipet, kamar hitung *Neubauer* dan pipet *Haemocytometer* merk Asisstent buatan Jerman, dan *handtally counter*. Alat yang digunakan untuk proses pengenceran adalah gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, mikro pipet 0,05 mL dan 0,1 mL. Alat yang digunakan untuk pembekuan sperma antara lain kontainer berisi Nitrogen cair merk Taylor-Wharton buatan USA, straw 0,25 mL, modifikasi spuit 1 mL, pinset, gunting, lampu spiritus, dan *aluminium foil*. Alat yang digunakan untuk *thawing* sperma beku adalah gelas beaker 1000 mL, pinset, termometer, dan termos.

**Bahan.** Bahan yang digunakan saat penampungan sperma adalah air keran suhu 25 sampai 27°C dan tisu. Bahan yang

digunakan saat pemeriksaan sperma adalah larutan *hayem* untuk pemeriksaan konsentrasi sperma, spiritus, dan larutan pewarna eosin untuk pembuatan preparat apus. Pengenceran sperma menggunakan larutan pengencer BPSE berdasarkan komposisi Sexton (1977) lalu diberi antibiotik Gentamicin dengan dosis 5 µg/mL. Bahan yang digunakan saat pembekuan sperma adalah krioprotektan *Dimethylacetamide* (DMA) merk Germany dan air dingin. Bahan yang digunakan saat *thawing* adalah air es suhu 4°C.

### Metode

Penampungan sperma dilakukan dengan metode pengurutan sesuai metode Blesbois *et al.* (2005). Penampungan dilakukan setiap satu minggu pada pagi hari pukul 07.00 sampai 08.00 sebanyak lima kali penampungan. Penilaian kualitas sperma dilakukan saat sperma segar meliputi kualitas makroskopis dan kualitas mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis dilakukan secara visual meliputi pH, warna, volume, dan konsistensi. Pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas, konsentrasi, viabilitas, dan abnormalitas. Motilitas *spermatozoa* dinilai sesuai penilaian Ismaya (2014). Konsentrasi *spermatozoa* dihitung dengan rumus seperti yang digunakan Dethan *et al.*, (2010). Viabilitas atau persen *spermatozoa* hidup dan mati diamati dengan membuat preparat apus sesuai metode yang digunakan oleh Layla dan Siti, (2002). Abnormalitas *spermatozoa* dapat dihitung dengan pembuatan preparat

apus sesuai metode Rusmiati (2007). Banyaknya jumlah bahan pengencer yang ditambahkan dihitung dengan rumus seperti yang digunakan Mumu (2009).

Pembekuan sperma dilakukan dengan pembuatan bahan pengencer ditambah dengan tiga macam level krioprotektan DMA yaitu 10 (P1), 14 (P2), dan 18% (P3). Larutan kemudian ditambahkan pada sperma secukupnya hingga diperoleh konsentrasi  $5 \cdot 10^8$  per mL, dikemas ke dalam straw 0,25 mL dengan alat spuit. Pembekuan yang dilakukan adalah dengan metode lambat seperti yang dilakukan Mumu (2009). Ekuilibrasi dilakukan selama 60 menit pada suhu 5°C kemudian dilakukan fitrifikasi. Straw yang sudah siap dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi nitrogen cair dengan suhu -196°C.

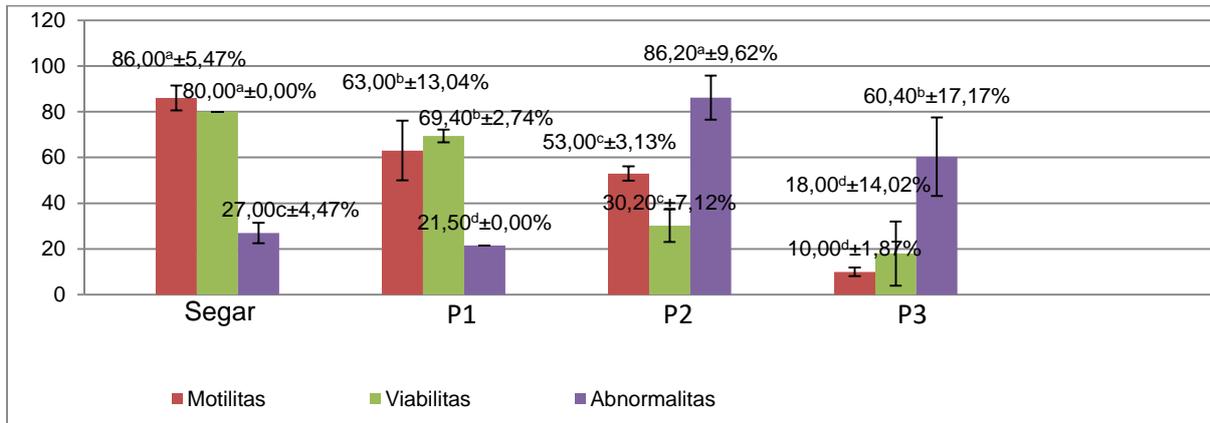
### Analisis data

Kualitas sperma segar dianalisis dengan rerata dan standar deviasi. Pengaruh perbedaan konsentrasi krioprotektan 10,14 dan 18% terhadap kualitas *spermato-zoa* setelah pembekuan meliputi motilitas, viabilitas, dan abnormalitas dianalisis menggunakan analisis variansi rancangan acak lengkap. Hasil signifikan dilanjutkan dengan uji perbandingan *mean Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

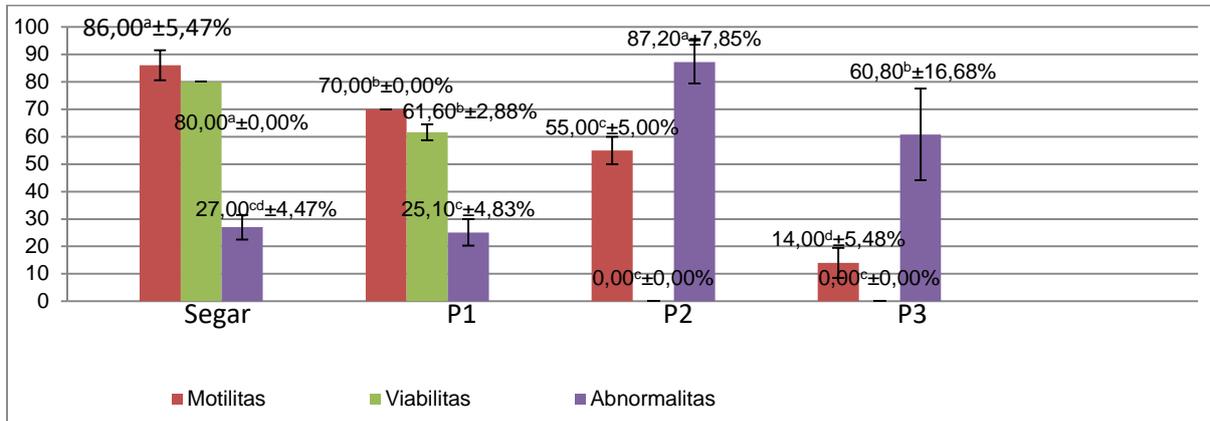
### Hasil dan Pembahasan

Sperma segar dikoleksi dan dicampur untuk mendapatkan volume sperma yang sesuai. Hasil yang diperoleh untuk sperma segar dari 5 replikasi adalah volume  $4,16 \pm 0,63$  mL dengan motilitas  $86 \pm 5,47\%$ , viabilitas  $80,00 \pm 0,00\%$ , dan ab-normalitas

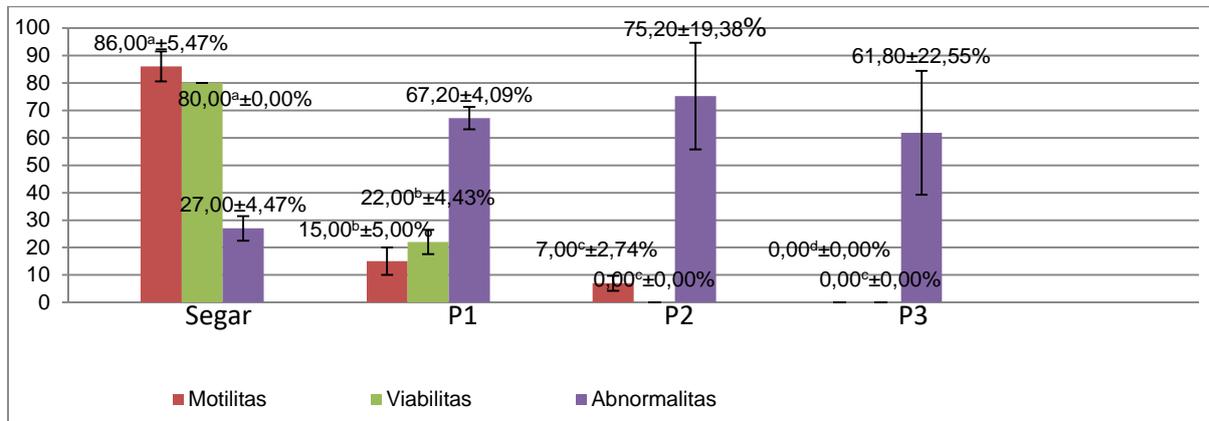
$27 \pm 4,47\%$ . Hasil menunjukkan penurunan yang besar pada kualitas sperma setelah pembekuan. Berikut adalah grafik penurunan kualitas sperma dilihat saat proses pengenceran, ekuilibrasi, dan setelah thawing dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3.



Gambar 1. Penurunan kualitas sperma setelah pengenceran



Gambar 2. Penurunan kualitas sperma setelah ekuilibrasi



Gambar 3. Penurunan kualitas sperma setelah *thawing*

Berdasarkan kualitas sperma segar yang diperoleh memiliki kualitas yang baik dan layak untuk proses pembekuan. Kualitas sperma segar yang dihasilkan menunjukkan bahwa ayam jantan mampu bereproduksi dengan baik dan dalam keadaan sehat. Hasil uji kualitas sperma setelah pengenceran menunjukkan bahwa terlihat mulai ada penurunan kualitas yang cukup besar seperti tertera pada Gambar 1. Pengenceran sperma dengan perlakuan P1, P2, dan P3 berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) pada motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Proses ekuilibrisasi juga menunjukkan penurunan kualitas sperma. Proses ekuilibrisasi dengan perlakuan P1, P2, dan P3 berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) pada motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Pada proses setelah *thawing* diperoleh kualitas sperma yang sangat menurun. *Thawing* dengan perlakuan P1, P2, dan P3 berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) pada motilitas dan viabilitas tetapi tidak berpengaruh pada abnormalitas.

Pada perlakuan P3 menunjukkan hasil paling rendah.

Konsentrasi krioprotektan DMA yang digunakan harus sesuai. Pada dasarnya penambahan DMA meningkatkan tekanan osmotik pengencer, sehingga banyak terjadi pengeluaran air dari dalam sel sperma untuk menyeimbangkan tekanan, oleh karena itu banyak *spermatozoa* mati setelah berinteraksi dengan DMA. Ketidakseimbangan cairan dalam sel sperma menyebabkan sel mengalami dehidrasi tinggi selama pembekuan sehingga diperoleh banyak *spermatozoa* mati setelah mengalami *thawing*. Dehidrasi sel sperma meningkat pada lingkungan hiperosmotik sehingga substansi sel berdifusi keluar dan mengganggu metabolisme *spermatozoa* (Blesbois *et al.*, 2005). Bahan pengencer yang digunakan seharusnya lebih cair tetapi penambahan krioprotektan harus sesuai. Abnormalitas meningkat pada penambahan DMA 14% tetapi turun pada penambahan 18%, hal ini

dapat disebabkan DMA mampu melindungi membran sel dari *coldshock* selama pembekuan sehingga pada konsentrasi lebih tinggi morfologi *spermatozoa* terlihat normal walaupun sudah mati. Menurut Tsetulin *et al.* (1999), DMA adalah krioprotektan paling baik untuk pembekuan sperma ayam.

### Kesimpulan

Penggunaan DMA sebagai krioprotektan tidak boleh lebih dari 10% karena sangat menurunkan kualitas sperma selama pembekuan, tetapi penggunaan DMA mampu mempertahankan morfologi *spermatozoa*.

### Daftar Pustaka

- Blesbois, E., I. Grasseau, and F. Seigneurin. 2005. Membran Fluidity and the Ability of Domestic Bird Spermatozoa to Survive Cryopreservation. *J.Soc.for Rep.and Fert.* 129:371-378.
- Dethan, A. A., Kustono, dan H. Hari. 2010. Kualitas dan Kuantitas Sperma Kambing Bligon Jantan yang diberi Pakan Rumput Gajah dengan Suplementasi Tepung Darah. *Buletin Peternakan* 34(3):145-153.
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Layla, Z. Dan A. Siti. 2002. Uji Kualitas Sperma dan Penghitungan Jumlah Pengencer dalam Upaya Menentukan Keberhasilan Inseminasi Buatan. Temu Teknis Fungsional non Peneliti Balitnak. Pp 128-132.
- Mumu, M.I., 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan menggunakan Krioprotektan Gliserol. *J. Agroland.* 16 (2): 172-179.
- Partyka, A., W. Nizanski, and E. Lukaszewics. 2010. Evaluation of Fresh and Frozen-Thawed Fowl Semen by Flow Cytometry. *Theorigenology.* 74:1019-1027.
- Rusmiati. 2007. Pengaruh Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L) terhadap Viabilitas *Spermatozoa* Mencit Jantan (*Mus musculus* L). *Bioscientiae* 4:63-70.
- Seigneurin, F., I. Grasseau, E. Blesbois, and H. Chapuis. 2013. An Efficient Method of Guinea Fowl Sperm Cryopreservation. *Poultry Science* 92:2988-96.
- Sexton, T.J. 1977. A New Poultry Semen Extender 1. Effect of Extension on the Fertility of Chicken Semen. Animal Physiology and Genetics Institute, Agricultural Research Service. Pp. 1443-1446.
- Tsetulin, K., F. Seigneurin, and E. Blesbois. 1999. Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. *Journal Poultry Science* 78:586-590