

Kualitas Spermatozoa Beku Babi Landrace dalam Pengencer Sitrat-Kuning Telur dengan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda

*Magdalena S. Dede, Wilmientje M . Nalley, Aloysius Marawali, Ni Made Paramita Setyani

Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan Universitas Nusa Cendana

*Penulis korespondensi, e-mail: Chindidhede@Gmail.Com

Abstrak: Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan pengencer sitrat-kuning telur (S-KT) dengan konsentrasi level gliserol yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa beku babi landrace. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan gliserol yaitu: P₁ (4%), P₂ (6%), P₃ (8%) dan P₄ (10%) dan empat ulangan. Spermatozoa yang digunakan berupa spermatozoa segar dari 4 ekor pejantan babi landrace berusia 2–3 tahun dikoleksi menggunakan metode glove gland. Evaluasi kualitas spermatozoa dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Spermatozoa diencerkan menggunakan pengencer dasar, lalu dilakukan proses holding time. Spermatozoa kemudian diproses melalui sentrifugasi. Setelah itu, bagian supernatant dibuang, dan pellet yang tersisa diencerkan kembali. Selanjutnya dihomogenkan dan dibagikan pada empat tabung perlakuan. Kemudian spermatozoa dievaluasi untuk mengetahui motilitas, viabilitas, dan abnormalitas. Spermatozoa kemudian dimasukkan ke dalam straw berukuran 0,5 mL dan diekuilibrasi. Kemudian, straw dibekukan, lalu disimpan dan dilakukan pengujian. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa motilitas spermatozoa setelah proses thawing tertinggi ditemukan pada perlakuan P3 nilai motilitas P3= 31,50±10,03%, diikuti P2= 25,88±8,85%, P4= 20,94±8,38% dan P1= 19,42±2,83% dan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) pada semua perlakuan. Dapat disimpulkan bahwa penggunaan pengencer sitrat kuning telur (S-KT) dengan konsentrasi gliserol yang berbeda mampu menghasilkan motilitas pasca thawing tertinggi yaitu pada P3 dengan nilai 31,50±10,03% yang layak digunakan untuk inseminasi buatan sesuai standar SNI spermatozoa beku babi.

Kata kunci: spermatozoa; landrace; sitrat-kuning telur; gliserol

Abstract: The purpose of this study was to determine the effect of the use of citrate-egg yolk (C-EY) diluents with different glycerol level concentrations on the quality of frozen landrace boars spermatozoa. This study used a completely randomized design with four glycerol treatments, namely: P1 (4%), P2 (6%), P3 (8%) and P4 (10%) and four replications. The spermatozoa used were fresh spermatozoa from 4 landrace pig males aged 2–3 years collected using the glove gland method. Evaluation of spermatozoa quality was carried out macroscopically and microscopically. Spermatozoa were then diluted using a basic diluent, then a holding time process was carried out. The spermatozoa were then processed by centrifugation. After that, the supernatant was discarded, and the remaining pellet was re-diluted using a basic diluent. Next, it was homogenized and distributed into four treatment tubes. Then the spermatozoa were evaluated for motility, viability, and abnormalities. The spermatozoa were then put into a 0.5 mL straw and equilibrated. After the equilibration process, the straw was frozen, then stored and ready to test. The results of the study revealed that the highest sperm motility after the thawing process was found in treatment T3, the motility value of T3 = $31.50 \pm 10.03\%$, followed by T2 = $25.88 \pm 8.85\%$, T4 = $20.94 \pm 8.38\%$ and T1 = $19.42 \pm 2.83\%$ and had no significant effect ($T> 0.05$) on all treatments. It can be concluded that the use of egg yolk citrate diluent (C-EY) with different glycerol concentrations is able to produce the highest post-thawing motility, namely in P3 with a value of $31.50 \pm 10.03\%$ which is suitable for use for artificial insemination according to the SNI standard for frozen porcine spermatozoa.

Keywords: spermatozoa; landrace; egg yolk citrate; glycerol

1. Pendahuluan

Proses pembekuan sperma babi memegang peranan yang signifikan dalam berbagai aspek peternakan yakni reproduksi hewan, konservasi genetik dan industri peternakan babi. Keuntungan pembekuan spermatozoa babi yaitu dapat memperpanjang penyimpanan

spermatozoa pejantan unggul, memungkinkan program IB dilakukan skala besar, mengurangi biaya pemeliharaan, mempertahankan genetik langka, meningkatkan produksi daging khususnya daging babi. spermatozoa babi mempunyai volume yang besar dan sangat peka terhadap kejutan dingin (*cold shock*) dibandingkan dengan spermatozoa hewan domestik lainnya (Wawang *et al.*, 2024). Membran plasma spermatozoa babi sangat sensitif terhadap perubahan suhu selama proses penyimpanan pada suhu dingin. Selama proses pendinginan menurut Bebas dan Gorda. (2020) bahwa asam lemak tak jenuh ganda menurun secara drastis akibat terjadi proses peroksidasi lipid. Spermatozoa diserap oleh oksigen reaktif atau *reactive oxygen species* (ROS) merupakan radikal bebas yang berupa oksigen yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif terhadap molekul protein, DNA, lemak membran sel, dan komponen sel atau jaringan yang lain. *Reactive oxygen species* (ROS) dihasilkan pada saat terjadinya metabolisme oksidatif dalam tubuh seperti proses oksidasi makanan menjadi energi. Penambahan asam lemak ke dalam pengencer dapat meminimalkan pembentukan ROS dan melindungi fungsi membran plasma (Hilmi *et al.*, 2018).

Pengencer yang sering digunakan untuk pengenceran spermatozoa adalah sitrat-kuning telur pada babi landrace (Nahak *et al.*, 2022) Tris- kuning telur pada babi landrace (Lawa *et al.*, 2021) pengencer *beltsville thawing solution* (BTS) pada babi landrace (Zou *et al.* 2004), air kelapa pada babi landrace (Hine *et al.*, 2019) dan *astaxanthin fosfat* kuning telur bebek pada babi duroc (Bebas dan Gordan 2020). Pengencer yang digunakan pada penelitian ini adalah sitrat yang mengandung bahan penyanga (*buffer*). Kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein yang dapat mempertahankan dan mengatur pH spermatozoa dan mencegah terjadinya *cold shock* akibat penurunan temperatur yang mendadak (Yekti *et al.*, 2023). Kuning telur banyak mengandung nutrisi untuk kebutuhan hidup spermatozoa serta terdapat *phosphatidylcholine* yang dipercaya mampu melindungi membran spermatozoa dengan memulihkan kehilangan fosfolipid, adanya lesitin dan lipoprotein yang bekerja mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dan sel spermatozoa (Wawang *et al.*, 2024). Kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin (Nahak *et al.*, 2022).

Krioprotektan yang sering digunakan yaitu gliserol dikenal sebagai krioprotektan intraseluler Dongkot *et al.* (2022) menyatakan bahwa gliserol berfungsi melindungi bagian internal sel spermatozoa selama proses pembekuan mencegah pengkristalan dan melindungi dari kejutan dingin dalam spermatozoa sehingga mampu meningkatkan daya hidup spermatozoa. Gliserol sebagai krioprotektan intraseluler dapat mempertahankan motilitas spermatozoa babi pada saat *post thawing* serta dapat mencegah kematian dari spermatozoa pada saat dibekukan (Susiana *et al.*, 2021). Gliserol mampu berdifusi ke dalam sel spermatozoa dan mengikat sebagian air bebas, sehingga dapat menghindari terbentuknya kristal es. yang dapat mencegah kerusakan sel spermatozoa saat proses pembekuan spermatozoa (Sari *et al.*, 2014). Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa bila konsentrasi di dalam pengencer optimal dan gliserol juga dapat mencegah spermatozoa dari radikal bebas karena gliserol mengandung asam lemak 9-13,5% (lemak atau lipid) dikenal sebagai monoglisiderida (Wernke, 2014). Beberapa penelitian telah melaporkan konsentrasi gliserol yang optimal dalam pembekuan spermatozoa babi adalah 4-6%, dan pada konsentrasi 8% terjadi kerusakan sel (Bebas dan Gorda, 2020). Apabila berlebihan gliserol dapat menyebabkan perubahan tekanan osmotik yang akan berakibat dehidrasi spermatozoa, karena kekurangan cairan dalam spermatozoa sehingga dapat meningkatkan kematian sel spermatozoa akibat kerusakan organel-organel sel (Susiana *et al.*, 2021). Masalah yang mempengaruhi kualitas spermatozoa adalah proses pembekuan karena spermatozoa akan mengalami *cold shock* yang berkaitan dengan pembentukan kristal-kristal es. Pratiwi *et al.* (2023) melaporkan bahwa spermatozoa akan mengalami penurunan kualitas sekitar 10-40% pada saat pembekuan. Berdasarkan gambaran permasalahan diatas maka peneliti tertarik melakukan penelitian dengan judul

kualitas spermatozoa beku babi landrace dalam pengencer sitrat kuning telur dengan konsentrasi gliserol yang berbeda.

2. Materi dan Metode

Sebagai sumber semen dikumpulkan dari empat ekor babi jantan ras Landrace berusia 2–3 tahun yang telah mencapai kematangan seksual, terlatih dalam proses pengambilan semen, dan memiliki organ reproduksi yang normal serta sehat. Penelitian eksperimental ini menggunakan metode rancangan acak lengkap. Rancangan acak lengkap yang disusun sebagai berikut : P1 = Sitrat-Kuning Telur + 4 % Gliserol, P2 = Sitrat-Kuning Telur + 6% Gliserol, P3 = Sitrat-Kuning Telur + 8% Gliserol , P4= Sitrat-Kuning Telur + 10% Gliserol

Proses persiapan kuning telur dilakukan sebagai berikut: a) Telur dibersihkan menggunakan alkohol 70% yang diaplikasikan dengan kapas untuk memastikan kebersihan dan sterilisasi, kemudian telur dipecahkan pada ujung yang tumpul dan kuning telur dipisahkan dari putih telur dengan cara ditiriskan. b) Kuning telur ditempatkan pada kertas saring, kemudian putih telur dipisahkan dengan cara memutar kertas hingga seluruh putih telur terserap. c) Kuning telur dipecahkan dengan menyobek jaringan vitelin dan secara perlahan dialirkkan ke dalam gelas ukur. d) Kuning telur siap digunakan. Sodium sitrat sebanyak 2,9 g ditimbang dan dilarutkan dalam aquades hingga volume mencapai 100 mL dalam tabung erlenmeyer. Selanjutnya, ditambahkan penicillin 1000 IU/mL dan streptomisin 1 mg/mL untuk mencegah pertumbuhan mikroorganisme selama proses preservasi. Pengencer Sitrat-Kuning telur dibuat dengan komposisi larutan sitrat 80% dan kuning telur 20%, lalu dihomogenkan menggunakan magnetic siter dengan bantuan spin bar. Sitrat kuning telur dibagi dalam empat tabung kemudian tambahkan gliserol sesuai perlakuan yaitu: 4%, 6%, 8%, 10%, homogenkan pengencer dan krioprotektan menggunakan pipet

Semen segar yang diperoleh segera diperiksa dan dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan secara makroskopis meliputi pemeriksaan volume (mL), konsistensi, warna, dan pH. Pemeriksaan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Karakteristik kualitas semen segar dengan rataan motilitas $77,5 \pm 2,88\%$, konsentrasi $167,75 \pm 39,19 \times 10^6$ sel/, viabilitas $91,45 \pm 3,14\%$ dan abnormalitas $5,81 \pm 1,26\%$ yang digunakan dalam penelitian ini.

Semen dibagi kedalam 4 tabung 15 mL yang sudah terdapat pengencer dasar dengan perbandingan 7:7 Proses dilanjutkan dengan holding time pada suhu 27-28°C selama dua jam. Setelah itu, spermatozoa disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang, dan pellet diencerkan kembali dengan perbandingan 1:1 menggunakan pengencer dasar sitrat kuning telur. Kemudian, spermatozoa diencerkan dalam pengencer penelitian hingga mencapai konsentrasi $600 \times 10^6 / 0,5$ mL. Semen yang telah diencerkan dalam pengencer penelitian kemudian dikemas dengan cara semen dimasukan kedalam straw 0,5mL yang sudah diberi kode menggunakan sput modifikasi. spermatozoa dilakukan evaluasi pasca pengenceran terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas.

Straw yang telah dikemas dalam 0,5 mL straw dan diberi kode kemudian disusun dalam rak pembekuan untuk dilakukan ekuilibrasi pada suhu 3-5°C selama 2 jam. Setelah proses ekuilibrasi dan evaluasi sesuai perlakuan, straw yang berisi spermatozoa kemudian dilanjutkan ke tahap pembekuan.

Proses pra-pembekuan dilakukan dengan menempatkan rak yang berisi straw spermatozoa di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -110°C) pada jarak 10 cm selama 10 menit. Setelah itu, straw dicelupkan ke dalam nitrogen cair (sekitar -196°C). Straw yang sudah membeku kemudian dimasukkan ke dalam goblet dan disimpan dalam kontainer nitrogen cair selama 24 jam. Setelah penyimpanan, spermatozoa yang sudah dibekukan akan dicairkan kembali.

Untuk evaluasi hasil, straw spermatozoa beku dicairkan dalam waterbath pada suhu 35°C selama 30 detik detik menurut (SNI 2024). straw dikeringkan dan dipotong masukan spermatozoa dalam eppendorf. Satu tetes spermatozoa diteteskan ke *objek glass* dan ditutupi dengan *cover glass* kemudian dievaluasi kualitas spermatozoa.

Variabel yang diamati dalam penelitian ini terdiri dari:

1. Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa dalam melakukan gerak maju atau progresif. Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan dengan menempatkan satu tetes spermatozoa di atas kaca *objek glass*, kemudian ditutup dengan kaca penutup dan diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran 400. Pengamatan dilakukan secara subjektif untuk mengamati spermatozoa yang bergerak progresif, dengan penilaian secara subjektif melihat perbandingan gerak progresif pada sepuluh lapang pandang dengan nilai yang diberikan 0 hingga 100% dengan skala 5%.

2. Viabilitas.

Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa yang diamati dengan cara pewarnaan diferensial dengan menggunakan zat pewarna eosin-negrosin. Buatlah preparat ulas dengan cara meneteskan spermatozoa diatas objek glass, kemudian satu tetes spermatozoa ditambahkan lagi pada objek glass yang sudah ditetesi dengan pewarna eosin-negrosin. Selanjutnya, campur secara merata, lalu diulasi menggunakan objek gelas lainnya lalu dikeringkan. Kemudian amati viabilitas spermatozoa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan kepala spermatozoa tidak menyerap warna eosin-negrosin sedangkan spermatozoa yang mati ditandai dengan kepala spermatozoa berwarna merah karena spermatozoa yang mati menyerap warna.

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{Total spermatozoa yang terhitung}} \times 100\%$$

3. Abnormalitas.

Pengamatan abnormalitas spermatozoa dapat dilakukan dengan menggunakan pewarna differensi eosin-negrosin, kemudian diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x40. Spermatozoa abnormal dapat dilihat dari bentuk morfologi pada bagian kepala, leher, dan ekor. Rumus untuk menghitung jumlah spermatozoa abnormal adalah:

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang abnormal}}{\text{Total spermatozoa yang terhitung}} \times 100\%$$

4. Recovery Rate Spermatozoa

Recovery rate (RR) merupakan kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa pasca *thawing* dan motilitas spermatozoa segar. Perhitungan nilai *recovery rate* menggunakan rumus:

$$\text{Recovery Rate} = \frac{\text{Nilai motilitas pasca thawing}}{\text{Nilai motilitas sepermatozoa segar}} \times 100\%$$

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA), kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan. Proses analisis dilakukan dengan bantuan perangkat lunak SPSS versi 27 for Windows

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Kualitas Semen Segar

Evaluasi semen dilakukan langsung setelah penampungan agar kualitas semen tetap terjaga dan pemeriksaan semen dilakukan di laboratorium. Pemeriksaan semen dilakukan dengan cara makroskopis dan mikroskopis kegunaannya untuk mengetahui kelayakan semen dalam proses selanjutnya.

Tabel 1. Karakteristik semen segar babi landrace

Kualitas semen Babi Landrace		Nilai Rata-rata
Makroskopis	Volume (mL)	137±20,61
	Warna	Putih Susu
	Konsistensi	Encer
	pH	6,55±0,17
Mikroskopis	Motilitas(%)	77,5±2,88
	Viabilitas (%)	91,45±3,14
	Abnormalitas (%)	5,81±1,26
	Konsentrasi($\times 10^6$)sel/mL	167,75±39,19

Hasil Pemeriksaan secara makroskopis volume semen adalah 137±20,61 mL. Rataan volume semen yang diperoleh dalam penelitian tidak berbeda jauh jika dibandingkan dengan hasil penelitian Foeh (2015), yakni volume semen berkisar 139-205 mL dengan rerata 176±4,85 mL. Hasil ini berbeda jauh dengan penelitian Marlize *et al.* (2021) yang memperoleh volume semen lebih kecil, yaitu 119,50±20,19 mL dan Mega *et al.* (2022) yang melaporkan volume semen berkisar antara 109,5±2,52 mL. Meskipun demikian, hasil penelitian ini masih tergolong normal dan tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Ax *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa volume semen babi berkisar 100-450 mL. Warna spermatozoa yang diperoleh dari penelitian adalah putih susu dengan konsistensi encer. Warna semen dan konsistensi semen yang diperoleh dalam penelitian ini sama dengan hasil penelitian Marlize *et al.* (2021) yang melaporkan bahwa warna semen babi adalah putih susu dan konsistensi encer. Berbeda dengan penelitian Foeh *et al.* (2017) yang memperoleh warna semen babi putih keruh. pH semen yang diperoleh dari penelitian adalah 6,55±0,17 berbeda dengan penelitian Nahak *et al.* (2022) yang memperoleh pH 8,91. Penelitian ini masih dalam kategori normal menurut Garner dan Hafez (2000), yakni berkisar antara 6,4-7,8. Beberapa faktor yang mempengaruhi karakteristik secara makroskopis adalah variasi umur dari pejantan, tingkat stimulasi, kualitas pakan dan frekuensi ejakulasi. Hal ini sesuai dengan pernyataan Parker (2000), bahwa adanya variasi dalam volume semen dipengaruhi oleh umur ternak, metode penampungan, jumlah sampel dan frekuensi penampungan.

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis persentase motilitas spermatozoa menunjukkan rerata 77,5±2,88% dengan konsentrasi spermatozoa 167,75±39,19 $\times 10^6$ sel/mL. Hasil tersebut lebih tinggi dari hasil penelitian Marlize *et al.* (2021) yang melaporkan bahwa motilitas spermatozoa adalah 70,00% dengan konsentrasi 250,50±32,56 $\times 10^6$ sel/mL berbeda dengan hasil penelitian Garner dan Hafez (2000) serta Knox (2006), yakni konsentrasi spermatozoa berkisar antara 200-600 $\times 10^6$ sel/mL. Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa yang hidup diidentifikasi dengan tidak menyerap warna (transparan) pada bagian kepala spermatozoa, sedangkan spermatozoa yang mati ditandai dengan menyerap warna merah pada bagian kepala spermatozoa karena spermatozoa yang mati mengalami kerusakan membran sel yang menyebabkan kebocoran pada membran sel sehingga pewarna masuk dengan mudah dan memberi warna pada sel yang mati. Rataan viabilitas spermatozoa dari penelitian ini adalah 91,45±3,14%. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan yang dilaporkan Nahak *et al.* (2022) bahwa rataan viabilitas spermatozoa adalah 95,50% dan hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian Kaka (2020) yang melaporkan rataan viabilitas spermatozoa babi landrace adalah 79,19%. Hasil penelitian persentase abnormalitas spermatozoa adalah 5,81%. Sedikit berbeda dengan penelitian Pandahuki *et al.* (2024) yang mengatakan hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa mencapai 7,50% dan penelitian (Nahak *et al.*, 2022) yang menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa mencapai 7,5%. Beberapa faktor yang mempengaruhi motilitas dan konsentrasi spermatozoa antara lain adalah umur, jumlah ejakulat, interval penampungan, kondisi pejantan dan lingkungan (Sumardani *et al.*, 2019).

3.2. Pengaruh Level Gliserol terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas adalah pergerakan spermatozoa secara progresif atau pergerakan aktif maju ke depan. Kemampuan spermatozoa untuk bergerak progresif memiliki korelasi positif terhadap tingkat fertilitas spermatozoa. Oleh karena itu, penilaian motilitas digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa dalam membuahi sel telur atau ovum. Rataan nilai motilitas spermatozoa ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan motilitas spermatozoa spermatozoa beku dalam pengencer perlakuan

Perlakuan	Pasca pengenceran (%)	Pasca ekuilibrasi (%)	Pasca thawing (%)
P1	76,25±4,33	73,12±3,75	19,42±2,83
P2	76,25±4,33	73,12±3,75	25,88±8,85
P3	76,25±4,33	73,75±3,22	31,50±10,03
P4	76,25±4,33	73,75±3,22	20,94±8,38
P-value	1,00	0,98	0,19

Dari data yang disajikan pada Tabel 2, terlihat bahwa nilai motilitas spermatozoa pasca pengenceran dalam penelitian ini adalah 76,25±4,33% dan pasca ekuilibrasi berkisar antara 73,12±3,75%-73,75±3,22%. Motilitas spermatozoa pada perlakuan P1, P2, P3, dan P4 menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0,05$). Kondisi tersebut menunjukkan bahwa jumlah gliserol yang digunakan pada P3 merupakan dosis optimum untuk mempertahankan motilitas spermatozoa dalam kondisi baik. Jaimun *et al.* (2024) menyatakan bahwa konsentrasi gliserol yang optimum mampu mempertahankan motilitas spermatozoa karena gliserol dapat masuk dengan mudah ke dalam sel-sel spermatozoa, menciptakan keseimbangan jumlah elektrolit di dalam dan di luar sel.

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa level gliserol berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap motilitas pasca thawing spermatozoa babi landrace. Nilai motilitas tertinggi terdapat pada P3: 31,50±8,38% dan P2: 25,88±8,85% sedangkan nilai terendah terdapat pada P1: 19,42±2,83% dan P4: 20,94±8,38%. Berbeda jika dibandingkan dengan Setiono *et al.* (2015) motilitas setelah thawing adalah: 15,00±0,00% dengan pengencer gliserol 8% dan tidak berbeda jauh menurut Bebas dan Gorda (2020) yang menyatakan gliserol 8% nilai motilitasnya pasca thawing 29,60±1,14%. Berpengaruh tidak nyatanya masing-masing perlakuan tersebut karena penggunaan gliserol sampai pada tingkat 8% kedalam pengencer melindungi spermatozoa saat pembekuan sehingga daya hidup spermatozoa masih dapat dipertahankan karena proses masuknya gliserol kedalam sel secara perlahan-lahan dan bertahap, gliserol memiliki molekul kecil sehingga mudah masuk kedalam sel dan menyerap air bebas dalam sel untuk mengurangi konsentrasi air dalam sel sehingga mencegah pembekuan air di dalam sel yang menyebabkan kerusakan sel akibat pembentukan kristal es. Pernyataan ini didukung dengan pendapat Mansur (1963) menyatakan bahwa krioprotektan seperti gliserol dapat membantu mengurangi pembekuan air dalam sel dan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh pembentukan kristal es selama proses pembekuan ketika air dalam sel membeku, ia dapat membentuk kristal es yang tajam yang dapat merusak sel secara fisik. Kristal es ini dapat menembus membran sel dan menghancurkan struktur internal sel yang menyebabkan kerusakan yang parah pada sel untuk mengatasi masalah ini gunakan gliserol yang dapat membantu melindungi sel selama proses pembekuan dan pencairan kembali.

Lebih tingginya persentase motilitas sperma setelah pembekuan pada perlakuan gliserol 8% = 31,50±8,38% jika dibandingkan dengan Islamiati *et al.* (2016) level gliserol 8% yang menghasilkan motilitas pasca thawing yaitu: 48,76%. Penambahan gliserol 8% dalam pengencer sedikit optimal menyediakan perlindungan untuk kelangsungan hidup sperma selama berlangsungnya proses pembekuan. Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap sperma bila konsentrasi gliserol di dalam pengencer optimal, dan bila tidak optimal akan menimbulkan gangguan pada spermatozoa berupa penurunan kualitas spermatozoa. Mengacu pada hasil motilitas pasca-thawing yang diperoleh P3=31,50±8,38% diatas 30% artinya setelah proses pencairan (thawing) 30% sel

spermatozoa yang bergerak hal ini memungkinkan untuk digunakan program inseminasi buatan karena menurut SNI keberhasilan inseminasi buatan motilitas yang dihasilkan harus 30% agar dapat melakukan fertilisasi dan pembuahan pada sel telur.

3.3. Pengaruh Level Gliserol terhadap Viabilitas Spermatozoa

Perbedaan spermatozoa yang mati dan hidup dapat dilihat dengan warnanya setelah diberi penanda cairan eosin- negrosin. Spermatozoa hidup berwarna jernih, limfatik atau tidak berwarna, sedangkan spermatozoa mati berwarna merah (Ndeta *et al.*, 2015).

Tabel 4. Rataan viabilitas spermatozoa spermatozoa beku

Perlakuan	Pasca pengenceran (%)	Pasca ekuilibrasi (%)	Pasca thawing (%)
P1	89,69±3,76	86,71±1,28	35,75±5,34
P2	90,40±3,76	88,07±2,28	43,67±16,90
P3	91,10±2,97	86,45±2,51	55,72±16,02
P4	90,70±3,38	88,62±3,50	40,84±14,84
P-value	0,94	0,57	0,27

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa rata-rata viabilitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer S-KT dengan gliserol berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap nilai viabilitas spermatozoa sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan (pasca pengenceran, pasca ekuilibrasi dan pasca *thawing*). Hasil rataan nilai viabilitas pasca pengenceran berkisar antara 89,69±3,76-91%,10±2,97% dan pasca ekuilibrasi 86,71±1,28%-88,62±3,50%. Penurunan persentase viabilitas ini masih dalam kisaran normal yaitu >80% (Ax *et al.*, 2000). Kemudian Kostaman dan Sutama (2006) menyatakan bahwa persentase viabilitas spermatozoa lebih tinggi dari pada motilitas spermatozoa karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semua motif progresif.

Rataan nilai viabilitas pasca *thawing* tertinggi P3 dan P2 dengan masing-masing nilai-nilai sebesar P3: 55,72±16,02% dan P2:43,67±16,90% sedangkan P4: 40,84±14,84% dan P1: 35,75±5,34%. Hasil penelitian ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan Setiono *et al.* (2015) viabilitas pasca *thawing* 38,07 ± 1,23%. Rataan viabilitas tertinggi yang diperoleh pada P2 dan P3 diduga karena gliserol sudah berdifusi kedalam sel spermatozoa sehingga tercapainya keseimbangan konsentrasi elektrolit intra dan ekstra sel serta spermatozoa sudah dapat memanfaatkan semaksimal mungkin penggunaan laktosa dari gliserol untuk menghasilkan energi berupa adenosin triphosphate (ATP) Mega *et al.*, (2022). Peningkatan konsentrasi gliserol juga dapat mempengaruhi viabilitas pada P4 dengan menyebabkan karakteristik toksik gliserol dan efek metabolik yang merugikan. Setiono *et al.* (2015) mengaitkan penurunan viabilitas spermatozoa ini dengan toksitas gliserol. Gliserol dapat meningkatkan tekanan osmotik pelarut dan merusak metabolisme energi, terutama pada dosis besar. Tekanan osmotik yang berlebihan dapat menyebabkan dehidrasi. Dalam penelitian ini menambahkan 8% gliserol dalam pengencer sitrat kuning telur dapat memaksimalkan viabilitas spermatozoa babi sebesar 55,72±16,02%. Jika dibandingkan dengan Bebas dan Gorda (2020) viabilitas spermatozoa pasca thawing pada penambahan gliserol 8% yaitu 40,80±0,83%. Spermatozoa hidup setelah *thawing* masih baik meskipun mengalih penurunan hal ini disebabkan terjadinya *cold shock* dan kerusakan membran spermatozoa akibat pembentukan kristal-kristal es yang menimbulkan perubahan tekanan osmotik pada plasma spermatozoa dapat menurunkan permeabilitas membrane spermatozoa dan meningkatkan kerusakan yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa.

3.4. Pengaruh Level Gliserol terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas merupakan suatu penyimpangan morfologis yang dapat menurunkan fertilitas spermatozoa (Butar-butar, 2009). Persentase spermatozoa yang mengalami abnormalitas sangat penting karena sel-sel yang cacat dapat menghambat proses

pembuahan (Wawang *et al.*, 2024). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase abnormalitas pada semua perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa gliserol dalam pelarut sitrat kuning telur memberikan pengaruh yang relatif sama dan cukup baik dalam menghambat terjadinya peningkatan abnormalitas spermatozoa babi landrace. Angka abnormalitas disebabkan tidak hanya pada saat pembuatan preparat sebelum dilakukan pengamatan namun juga disebabkan oleh adanya peroksidasi lipid (Amtiran *et al.*, 2020).

Tabel 3. Rataan abnormalitas spermatozoa spermatozoa beku

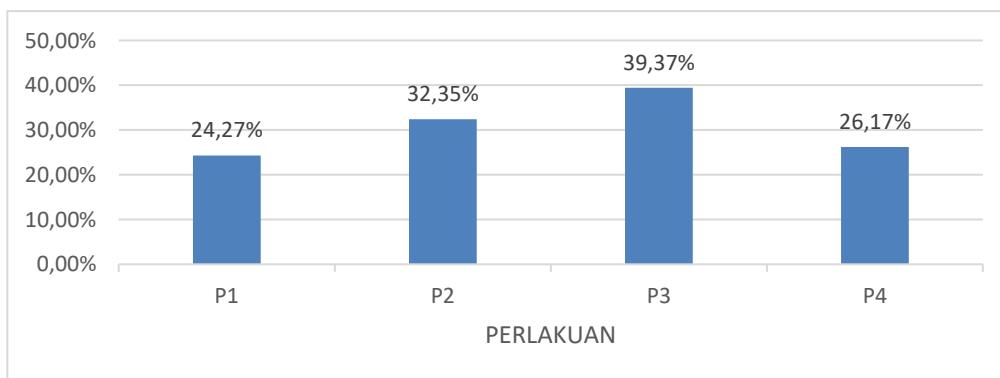
Perlakuan	Pasca pengenceran (%)	Pasca ekuilibrasi (%)	Pasca thawing (%)
P1	5,45±1,09	6,03±0,69	11,23±2,25
P2	5,55±1,59	6,46±0,57	12,28±2,02
P3	5,46±1,54	6,33±0,82	11,87±1,61
P4	5,55±1,19	6,03±0,43	11,61±2,27
P-value	0,99	0,71	0,90

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa pasca thawing dalam pengencer S-KT dengan gliserol berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap nilai abnormalitas spermatozoa sebelum pembekuan dan sesudah pembekuan. Rataan-rataan abnormalitas pasca thawing tertinggi pada P2=12,28±2,02%, diikuti P3=11,87±1,61%, P4=11,61±2,27%, P1=11,23±2,25. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan Foeh *et al.* (2015) persentase abnormalitas spermatozoa babi adalah 11,1%. sedangkan menurut Johnson *et al.* (2000) persentase abnormalitas babi per ejakulat tidak boleh lebih dari 20%. Berdasarkan hasil analisis sidik ragam (ANOVA) menunjukkan bahwa pada perlakuan P2=12,28±2,02% penambahan gliserol 6% memperoleh abnormalitas tertinggi jika dibandingkan dengan Islamiati *et al.* (2016) memperoleh rataan abnormalitas pasca thawing dengan penambahan gliserol 6% adalah 15,5%. Hal ini dikarenakan Gliserol mampu meminimalisir kerusakan membran plasma akibat peroksidasi lipid, dengan cara mengikat gugus fosfolipid sehingga mengurangi ketidakstabilan membran dan dapat berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein (Parks and Graham, 1992), dengan kemampuan gliserol dalam meminimalisir kerusakan membran plasma maka akan mengurangi peningkatan abnormalitas yang disebabkan oleh adanya peroksidasi lipid. Mekanisme kerja dari gliserol yang lain adalah dengan mengubah bentuk dan ukuran kristal es yang terbentuk sehingga mengurangi tekanan mekanik dan menurunkan titik beku medium sehingga kristal es tidak terbentuk dan merusak organel sel spermatozoa (Tambing, 1999).

3.5. Pengaruh Level Gliserol terhadap Recovery Rate Spermatozoa

Recovery rate (RR) adalah ukuran kemampuan spermatozoa untuk pulih setelah proses pembekuan, yang dihitung dengan membandingkan motilitas spermatozoa setelah *thawing* dengan motilitas spermatozoa segar (Garner dan Hafez, 2000). *Recovery rate* menjadi salah satu indikator penting dalam menilai keberhasilan kriopreservasi spermatozoa. Selain itu, RR juga mencerminkan efisiensi dari proses pembekuan yang dilakukan semakin tinggi nilai RR, semakin optimal proses pembekuannya. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa sitrat-kuning telur dan konsentrasi gliserol yang berbeda berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) antar perlakuan terhadap *recovery rate* spermatozoa beku babi landrace dimana perlakuan P1,P2,P3 dan P4 berbeda tidak nyata. Hal ini diperjelas dengan rataan nilai recovery rate yang diperoleh yaitu rataan *recovery rate* tertinggi terdapat pada P3: 39,37±12,54% dan diikuti dengan P2: 32,35±11,06% sedangkan rataan nilai terendah terdapat pada P1:24,27±3,53% dan diikuti dengan P4: 26,17±10,47%. Penelitian ini lebih rendah Jika dibandingkan dengan Irawan (2016) nilai *recovery rate* yang diperoleh 46,46% pada penambahan gliserol 8%. Rendahnya nilai *recovery rate* yang mendapat perlakuan P1:24,27±3,53% diduga karena spermatozoa belum beradaptasi secara sempurna dengan pengencer, krioprotektan gliserol. Hal ini mengakibatkan spermatozoa

mudah mengalami *cold shock* serta terjadinya pembentukan kristal es. Rendahnya nilai *recovery rate* pada P4: $26,17 \pm 10,47\%$. Hal ini mungkin disebabkan oleh konsentrasi gliserol yang berlebihan sehingga menimbulkan efek toksik pada sperma.



Gambar 1. *Recovery rate spermatozoa babi landrace*

Setiono *et al.* (2015) melaporkan bahwa gliserol yang terlalu banyak dapat memberikan dampak negatif bagi spermatozoa, karena dapat menghambat pergerakan spermatozoa. Sebaliknya, jika gliserol digunakan dalam jumlah yang lebih sedikit spermatozoa lebih rentan terhadap pembekuan yang ekstrim yang dapat merusak membran plasma dan mengganggu metabolisme sel. Menurut Sutherland *et al.* (2015) Penilaian *recovery rate* berfungsi untuk menunjukkan efisiensi proses pembekuan ditunjukkan semakin tinggi RR, semakin baik kualitas pembekuan, yang berhubungan dengan meningkatnya integritas membran plasma. Hal ini penting untuk mendukung aktivitas metabolisme yang diperlukan bagi pergerakan spermatozoa.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penggunaan pengencer sitrat kuning telur (S-KT) dengan konsentrasi gliserol yang berbeda mampu menghasilkan kualitas spermatozoa beku babi landrace pasca *thawing* dengan nilai tertinggi terdapat pada P3= $31,50 \pm 10,03\%$ dan layak digunakan untuk program inseminasi buatan Sesuai standar SNI spermatozoa beku babi. Diperlukan pengujian terhadap ternak babi betina menggunakan inseminasi buatan untuk mengevaluasi tingkat keberhasilan pembekuan spermatozoa.

Daftar Rujukan

- Afrilia, K. N. 2016 . Pengaruh Penambahan L-Arginin dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Merino *Post Thawing* (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga). <http://repository.unair.ac.id/id/eprint/61918>
- Azzahra, F. Y., Setiatin, E. T., & Samsudewa, D. 2016. Evaluasi motilitas dan persentase hidup spermatozoa segar sapi PO Kebumen pejantan muda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 11(2), 99–107.
- Bebas, W., & Gorda, W. 2020. Kadar Krioprotektan Gliserol dan Dimethylsulfoxide Terbaik pada Pengencer Astaxanthin Fosfat Kuning Telur Bebek Terhadap Kualitas Spermatozoa Beku Babi. *Jurnal Veteriner Maret*, 21(1). <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2020.21.1.115>.
- Dongkot, S., Marawali, A., Hine, T. M., Nalley, W. M., Peternakan, P. S., Peternakan, F., Cendana, U. N., Adisucipto, J., & Timur, N. T. 2022. *The frozen sperm quality of duroc pig in modified tris diluent with different equilibration time) teknologi IB menggunakan spermatozoa cair maupun spermatozoa beku.* 105.

- Foeh, N. D. F. K. 2015. Kualitas Spermatozoa Beku Babi Dalam Pengencer Bts dan Mii Menggunakan Krioprotektan Dimethylacetamide dan Gliserol dengan Sodium Dedocyl Sulphate. *Tesis. Program Studi Biologi Reproduksi. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor (IPB).* <https://repository.ipb.ac.id/>.
- Hine, T. M., Uly, K., Nalley, W. M., & Armadianto, H. 2019. Kualitas Sperma Beku Sapi Bali dalam Pengencer Air Kelapa Modifikasi dengan Berbagai Aras Dimethyl Sulfoxide. *Jurnal Veteriner*, 20(1), 93. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.1.93>
- Irawan, Rona. Pengaruh Level Gliserol Dalam Pengencer Tris- Kuning Telur Terhadap Membran Plasma Utuh Dan Recovery Rate Sperma Kambing Peranakan Etawah Post Thawing. *Students e-Journal*, [S.l.], v. 5, n. 2, may 2016. Tersedia pada: <<http://jurnal.unpad.ac.id/ejournal/article/view/8752>>. Tanggal Akses: 16 mar. 2025
- Jaimun, D. M., Kune, P., Setyani, N. M. P., dan Uly, K. 2024. Pengaruh level gliserol dalam pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas spermatozoa Babi Landrace. *Agrivet: Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Dan Peternakan (Journal of Agricultural Sciences and Veteriner)*, 12(2), 197–205. <https://doi.org/10.31949/agrivet.v12i2.10693>.
- Kurnia Wawang, S., Nalley, M., & Mata Hine, T. 2024. Kualitas Spermatozoa Babi Landrace dalam Pengencer Sitrat-Kuning Telur dengan Substitusi Sari Buah Melon (*Cucumis melo L.*). *COMSERVA : Jurnal Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, 3(11), 4689–4699. <https://doi.org/10.59141/comserva.v3i11.1248>
- Lawa, A. B., Hine, T. M., & Nalley, W. M. 2021. Pengaruh Penambahan Virgin Coconut Oil, Minyak Ikan dan Minyak Zaitun dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Spermatozoa Cair Babi Landrace. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 16(2), 135–141. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.16.2.135-141>
- Manur, F. 2024. Pengaruh Substitusi Kuning Telur Bebek dalam Pengencer Spermatozoa Life Terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Landrace. *COMSERVA : Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*, 3(12), 4928–4938. <https://doi.org/10.59141/comserva.v3i12.1278>
- Maria G. Mega, Wilmientje M. Nalley, Aloysius Marawali, H. L. L. B. 2022. Spermatozoa Beku Babi Landrace Dalam Pengencer Durasperm. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 9(1), 57–65.
- Marlize, S., Hine, T. M., & Nalley, W. M. 2021. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Beku Babi Landrace Dalam Pengencer Durasperm Termodifikasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 8(2), 150–160. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v8i2.4867>
- Nahak, P. L., Dethan, A. A., & Kia, K. W. 2022. Kualitas Spermatozoa Babi Landrace Dalam Pengencer Spermatozoa Sitrat-Kuning Telur Yang Ditambah Glukosa Dengan Konsentrasi Berbeda. *Jas*, 7(1), 12–15. <https://doi.org/10.32938/ja.v7i1.1593>
- Nuba, M. D., Nalley, W. M., Made, N., Setyani, P., Hine, T. M., Peternakan, F., Cendana, U. N., Adisucipto, J., Timur, N. T., Reproduksi, L. B., & Cendana, U. N. 2024. *The Use of Glycerol Levels in Citrate-Egg Yolk Diluent to Maintain the Quality of Landrace Boar Spermatozoa at Storage Temperatures 18-20 o C ternak*. 8(3), 321–331.
- Pandahuki, F. O., Nalley, W. M., Uly, K., dan Mata Hine, T. 2024. Pengaruh Penambahan Ekstrak Biji Kelor Kering (*Moringa oleifera Lam*) dalam Pengencer Beltsville Thawing Solution terhadap Kualitas Spermatozoa Cair Babi Landrace. *Animal Agricultura*, 2(1), 488–498. <https://doi.org/10.59891/animacultura.v2i1.67>.
- Setiono, N., Suharyati, S., & Santosa, P. E. 2015. Kualitas spermatozoa beku sapi Brahman dengan dosis krioprotektan gliserol yang berbeda dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 3(2). <https://doi.org/10.23960/jipt.v3i2.p%25>

- Standar Nasional Indonesia. 2024. SNI 8034 : 2024 Spermatozoa Beku Babi. <https://nakeswan.bsi.p.pertanian.go.id/berita/sni-8034-2023-semen-cair-babi>. (diakses pada 8 Maret 2025)
- Susiana, S., Kalsum, U., & Sumartono, S. 2021. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Gliserol Pada Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Motilitas, Viabilitas Dan Abnormalitas Spermatozoa Beku Sapi Limousin. *REKASATWA : Jurnal Ilmiah Peternakan*, 3(2), 98. <https://doi.org/10.33474/rekasatwa.v3i2.13133>
- Sumardani, N. L. G., Budaarsa, K., Putri, T. I., dan Puger, A. W. 2019 . Umur Mempengaruhi volume spermatozoa dan motilitas spermatozoa babi landrace di Balai Inseminasi Buatan Baturiti, Tabanan, Bali. *Jurnal Veteriner*, 20(3), 324–329. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.3.324>.
- Tamoes, J. A., Nalley, W. M., dan Hine, T. M. 2014. Fertilitas Spermatozoa Babi Landrace dalam Pengencer Modifikasi Zorlesco dengan Susu Kacang Kedelai.
- Yekti, A. P. A., Setiawan, R. E. R., Rachmawati, A., & Susilawati, T. 2023. Kualitas Spermatozoa Beku Sapi Limousin setelah Thawing Menggunakan Air Dingin dengan Lama Waktu yang Berbeda. *Jurnal Agripet*, 23(1), 25–32. <https://doi.org/10.17969/agripet.v23i1.23331>