

Pengaruh Penambahan Glutathione pada Medium Pengencer Sperma terhadap Kualitas Semen Cair (*Chilled Semen*)

ENDANG TRIWULANNINGSIH¹, P. SITUMORANG, T. SUGIARTI, R.G. SIANTURI, dan D.A. KUSUMANINGRUM

Balai Penelitian Ternak, PO BOX 210, Bogor 16002

¹E-mail: etriwulanningsih@yahoo.com

(Diterima dewan redaksi 22 Mei 2003)

ABSTRACT

TRIWULANNINGSIH, E., P. SITUMORANG, T. SUGIARTI, R.G. SIANTURI, and D.A.Kusumaningrum. 2003. The effect of glutathione addition in sperm diluent on the quality of bovine chilled semen. *JITV* 8(2): 91-97.

This study has been conducted at the Laboratory of Physiology Reproduction, Research Institute for Animal Production (RIAP), Ciawi-Bogor, West Java. Sperms were collected from FH bulls with body weight 613 kg (FH-1) and 480 kg (FH-2) twice a week. Briefly after quality evaluation, semen was diluted in Tris-Citrate buffer medium, containing egg yolk (20% v/v) and (4% v/v) glycerol to get spermatozoa concentration of 50×10^6 per ml. Sperm diluents were added with glutathione (GSH) with doses of 0.0; 0.5; 1.0 and 1.5 mM as treatments A, B, C and D respectively. The diluted semen was then cooled from 35 to 5°C using a cooling machine for 60 minutes then stored in the refrigerator (5°C). Recorded parameters were the survivability of spermatozoa by evaluating the percentage of motile and live, the condition of acrosome and plasma membrane. Data were analysed by completely randomised design with the general linear model (GLM) procedure. The characteristics of collected semen were normal. Viability of spermatozoa stored at 5°C for 0, 1, 4 and 8 days shown by intact acrosomal were 74.42; 69.27; 57.80 and 42.58% for A, B, C and D respectively. Those data were significantly different ($P < 0.01$). Motility, live and intact plasma membrane were 46.72; 52.34; 53.44 and 51.09%; 63.59; 69.11; 68.64; and 66.89%, and 66.01; 69.75; 68.38 and 68.44% for treatment A, B, C and D respectively. Additional 0.5 mM GSH gave the highest ($P < 0.01$) motility, live and intact plasma membrane of sperm. Therefore, it is concluded that the effect of addition 0.5 mM of GSH to the sperm diluents can improve the viability of spermatozoa and possibly protect the spermatozoa from free radical damage.

Key words: Glutathione, viability, spermatozoa

ABSTRAK

TRIWULANNINGSIH, E., P. SITUMORANG, T. SUGIARTI, R.G. SIANTURI, dan D.A. KUSUMANINGRUM. 2003. Pengaruh penambahan glutathione pada medium pengencer sperma terhadap kualitas semen cair. *JITV* 8(2): 91-97.

Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak (BALITNAK), Ciawi-Bogor, Jawa Barat. Semen ditampung dua kali per minggu dengan menggunakan vagina buatan dari dua ekor pejantan sapi FH yang berumur sekitar 3,5 tahun, masing-masing berbobot hidup 613 kg (FH-1) dan 480 kg (FH-2). Setelah dievaluasi, semen diencerkan dengan menggunakan medium Tris-Sitrat buffer medium, yang mengandung 20% (v/v) kuning telur dan 4% (v/v) gliserol hingga diperoleh konsentrasi spermatozoa 50×10^6 per ml. Pengencer sperma ditambah glutathione (GSH) masing-masing dengan dosis 0,0; 0,5; 1,0 dan 1,5 mM sebagai perlakuan A, B, C dan D. Setelah semen diencerkan, kemudian didinginkan dari suhu 35 menjadi 5°C dengan menggunakan mesin pendingin selama 60 menit dan dipertahankan pada suhu tersebut dengan menyimpannya di dalam refrigerator (5°C) selama 8 hari. Pengamatan kualitas semen dilakukan dengan parameter persentase motil, hidup, TAU dan MPU pada hari ke 0, 1, 4 dan 8. Semua data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan model linear umum. Karakteristik semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah normal. TAU spermatozoa pada suhu 5°C berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) antar hari pengamatan yaitu 74,42; 69,27; 57,80; 42,58%, berturut-turut pada hari ke 0, 1, 4 dan 8. Sementara itu, antar perlakuan penambahan GSH adalah 60,82; 62,75; 61,76; 58,73% masing-masing untuk perlakuan A, B, C dan D. Rataan persentase motilitas adalah 46,72; 52,34; 53,44 dan 51,09% rata-rata persentase hidup adalah 63,59; 69,11; 68,64; 66,89%, rata-rata persentase membran plasma utuh adalah 66,01; 69,75; 68,38 dan 68,44% masing-masing untuk perlakuan A, B, C dan D. Penambahan 0,5 mM glutathione memberikan hasil yang terbaik ($P < 0,01$) terhadap motilitas, persentase hidup dan persentase membran plasma utuh dari spermatozoa. Dapat disimpulkan bahwa penambahan glutathione sebanyak 0,5 mM pada medium pengencer semen cair, dapat meningkatkan viabilitas semen cair dan mungkin dapat mencegah kerusakan spermatozoa dari radikal bebas.

Kata kunci: Glutathione, viabilitas, spermatozoa

PENDAHULUAN

Teknologi Inseminasi Buatan telah secara luas dilakukan, khususnya pada sapi perah, namun keberhasilan tingkat kebuntingannya masih tergantung pada teknologi pengawetan spermatozoa disamping faktor manusia (peternak dan inseminator). Proses pembekuan spermatozoa dengan menurunkan suhu hingga mencapai -196°C di dalam nitrogen cair, menyebabkan sekitar 30% spermatozoa akan mati (GOLDMAN *et al.*, 1991; PARK dan GRAHAM, 1992).

Pada proses pembekuan semen, masalah yang sering timbul adalah rusaknya membran plasma spermatozoa akibat terbentuknya peroksidasi lipida. Keadaan ini terjadi karena membran spermatozoa banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap kerusakan peroksidasi (MAXWELL dan WATSON, 1996). Selanjutnya SIKKA (1996) menyatakan bahwa spermatozoa mamalia kaya akan asam lemak tidak jenuh dan bersifat sangat mudah terkena ROS (*reactive oxygen soecies*) yang dapat mengakibatkan penurunan motilitas spermatozoa dan meningkatkan kerusakan morfologi yang berpengaruh terhadap kapasitas sperma dan reaksi akrosome. Peroksidasi lemak pada membran plasma merupakan mekanisme kunci dari pada ROS yang mengakibatkan kerusakan spermatozoa dan infertilitas, kecuali itu peroksidasi lemak dapat merusak DNA dan protein.

Glutathione ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$) dan derivatnya yang merupakan tripeptida ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) dapat mempengaruhi banyak aspek metabolisme (DE MATOS dan FURNUS, 2000), diantaranya membantu detoksifikasi dan transport dari $\gamma\text{-glutamil-amino acid}$. WIJAYA (1996) menyatakan bahwa glutathione adalah antioksidan primer yang bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal bebas baru. Antioksidan ini mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang kurang mempunyai dampak negatif. Menurut KARYADI (1997) radikal bebas merupakan atom atau molekul yang sifatnya sangat tidak stabil karena mempunyai satu elektron atau lebih yang tidak berpasangan, sehingga untuk memperoleh pasangan elektron, senyawa ini bereaksi dengan atom atau molekul lain seperti asam lemak tidak jenuh, protein, asam nukleat atau lipopolisakarida, yang berakibat akan menimbulkan senyawa yang tidak normal. Pengaruh negatif dari peroksida lemak terhadap sel somatik antara lain menghambat metabolisme oksidatif dan glikolisis, lisis pada eritrosit, oksidasi pada sulfhydryl dan menghambat kerja enzim-SH, modifikasi protein dan asam amino, kerusakan membran, inaktivasi enzim pengikat membran dan denaturasi DNA (WHITE, 1993; SIKKA, 1996). Penambahan glutathione di dalam medium pengencer spermatozoa diharapkan dapat mengurangi atau mencegah timbulnya radikal bebas yang akan merusak membran plasma, sehingga daya

fertilitas semen cair meningkat yang pada akhirnya akan meningkatkan derajat konsepsi (C/R) dan persentase kebuntingan

Faktor penghambat lain adalah ketersediaan nitrogen cair dan tabung nitrogen cair yang cukup mahal di daerah. Oleh sebab itu penggunaan semen cair merupakan alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi hambatan tersebut. Pada semen cair konsentrasi spermatozoa rendah dibandingkan semen beku, sehingga pada satu ejakulasi dapat digunakan untuk menginseminasi lebih banyak ternak betina yang estrus. Namun demikian, problem yang dihadapi adalah daya fertilitasnya sedikit menurun dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan semen cair tersebut. Pada penelitian sebelumnya SITUMORANG *et al.* (2001a) menyatakan bahwa persentase kebuntingan menurun setelah semen cair disimpan selama lebih dari empat hari. Salah satu penyebabnya adalah adanya radikal bebas yang dapat merusak sel spermatozoa. PARRIS (1998) menyatakan bahwa glutathione adalah antioksidan penting yang dapat memproteksi mitokondria dari kerusakan karena adanya radikal bebas. Glutathione dapat mengontrol homeostatic baik di dalam maupun di luar sel. Glutathione adalah antioksidan sulfhydryl (-SH), antitoksin dan kofaktor enzim. Berdasarkan sifat antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas, maka penambahan glutathione sebagai antioksidan primer diharapkan dapat mengurangi kerusakan membran plasma.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui teknologi pengawetan semen cair dengan penambahan glutathione dalam medium pengencer sperma.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak (BALITNAK) Ciawi-Bogor, dengan menggunakan dua ekor sapi pejantan yang berumur sekitar 3,5 tahun dengan bobot hidup 613 kg (FH-1) dan 480 kg (FH-2). Sebagai hewan pemancing digunakan sapi FH betina. Pakan yang diberikan berupa rumput gajah, 5 kg ampas tahu dan 6 kg konsentrat komersial. Semen dikoleksi dua kali per minggu dengan menggunakan vagina buatan.

Evaluasi semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi secara makroskopis meliputi: bau, warna, konsistensi dan volume serta dilakukan segera setelah semen ditampung. Sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi, konsentrasi, motilitas, persentase hidup, persentase tudung akrosom utuh (TAU) dan persentase membran plasma utuh (MPU).

Perlakuan yang diberikan adalah penambahan glutathione ke dalam larutan pengencer sebanyak 0 mM (kontrol), 0,5; 1,0 dan 1,5 mM, masing-masing sebagai perlakuan A, B, C dan D. Pengenceran dilakukan

dengan menggunakan Tris-sitrat *buffer* pada suhu 35°C dengan menambahkan medium pengencer A yang mengandung 20% (v/v) kuning telur dan 2,4% (v/v) gliserol sehingga diperoleh konsentrasi spermatozoa 100×10^6 per ml (Tabel 1). Larutan yang mengandung semen tersebut didinginkan dari suhu 35°C sampai mencapai 5°C dengan menggunakan mesin pendingin (*cooling machine*) selama 60 menit. Selama penurunan suhu, larutan B yang berisi Tris-sitrat *buffer* yang mengandung 20% (v/v) kuning telur dan 5,6% (v/v) gliserol ditambahkan pada saat suhu mencapai 15, 10 dan 5°C sehingga konsentrasi spermatozoa menjadi 50×10^6 per ml. Larutan semen sesuai perlakuan diperiksa viabilitasnya pada suhu 5°C dengan menghitung persentase motilitas, hidup, tudung akrosome utuh dan membrane plasma utuh pada hari ke 0, 1, 4 dan 8.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial (4 dosis

glutathionine dan 4 tingkat hari penyimpanan), dengan jumlah penampungan semen sebanyak delapan kali sebagai ulangan (SNEDECOR dan COCHRAN, 1974; STEEL dan TORRIE, 1991), selanjutnya data dianalisis dengan prosedur model linier umum (SAS, 1984).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata kualitas semen sapi FH (Tabel 2) yang digunakan dalam penelitian ini berada pada kisaran normal dan layak untuk diencerkan dan disimpan sebagai semen dingin (*chilled semen*) pada suhu 5°C. Hasil rata-rata volume semen segar dari kedua sapi FH tersebut berkisar 3,70 – 6,18 ml untuk FH-1 dan 3,02 – 6,22 ml untuk FH-2. Hasil ini berada pada kisaran normal. Volume semen setiap individu dipengaruhi oleh bobot hidup, pakan, libido, individu, frekuensi penampungan dan bangsa (TOELIHERE, 1993).

Tabel 1. Komposisi larutan Tris-Sitrat *buffer*

Bahan	Larutan A	Larutan B
Tris (Hydroxymethyl) amino methane, g	2.422	2.422
Asam sitrat, g	1,34	1,34
Fruktosa, g	1,0	1,0
Streptomycin, mg/ml	1000	1000
Benzylpenicillin, IU/ml	500	500
Gliserol, % (v/v)	2,4	5,6
Kuning telur, % (v/v)	20%	20%
Glutathione, mM	0; 0,5; 1,0; 1,5	0; 0,5; 1,0; 1,5

Tabel 2. Rataan kualitas semen segar dari dua ekor sapi FH

Penilaian semen	Sapi FH-1	Sapi FH-2
Makroskopis:		
Volume (ml)	4,94 ± 1,24	4,62 ± 1,60
Bau	normal	normal
Konsistensi	sedang-kental	sedang-kental
Warna	krem	krem
Mikroskopis:		
Konsentrasi (10^6 per ml)	1446 ± 284,1	1293 ± 155,4
Gerakan massa	+++	+++
Persentase spermatozoa hidup (%)	82,75 ± 2,00	82,13 ± 2,00
Persentase tudung akrosom utuh (%)	72,25 ± 1,54	71,13 ± 1,65
Persentase membran plasma utuh (%)	74,50 ± 3,62	70,25 ± 2,23

+++ Menggambarkan gerakan massa yang sangat baik

Hasil rata-rata konsentrasi spermatozoa yang digunakan sesuai dengan yang dilaporkan oleh TOELIHERE (1993), bahwa konsentrasi semen sapi berkisar antara 1.000-2.000 juta atau lebih spermatozoa per ml, mempunyai konsistensi yang kental dan berwarna krem. Konsentrasi semen banyak dipengaruhi oleh umur, variasi individu, pakan, besar testes dan perkembangan seksual (SALISBURY dan VAN DEMARK, 1985).

Tabel 3 menunjukkan persentase motilitas dan persentase hidup spermatozoa menurut dosis glutathione dan lama penyimpanan pada suhu 5°C. Ternyata makin lama disimpan, maka motilitas makin menurun. Hal ini sesuai dengan pendapat SITUMORANG *et al.* (2000b), yang menggunakan antioksidan vitamin E (α tocoferol) 0,1% dan fosfolipid. Tetapi bila diperhatikan pengaruh antioksidan glutathione terhadap motilitas, maka pemberian glutathione dapat meningkatkan motilitas ($P < 0,01$) $52,34 \pm 21,88$; $53,44 \pm 22,20$ dan $51,09 \pm 23,31\%$ masing-masing untuk perlakuan dosis glutathione 0,5; 1,0 dan 1,5 mM bila dibandingkan dengan tanpa glutathione ($46,72 \pm 23,17\%$). Tetapi antar perlakuan pemberian glutathione tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), berarti pemberian 0,5 mM glutathione ke dalam medium pengencer cukup efektif untuk melindungi membran plasma dan mempertahankan persentase motilitas spermatozoa yang disimpan pada suhu 5°C. Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh SINHA *et al.* (1996) bahwa pemberian glutathione sebanyak 5 mM ke dalam pengencer semen kambing dapat meningkatkan motilitas ($55,7$ vs $47,81\%$) disertai rendahnya abnormalitas akrosom ($6,22$ vs $10,10\%$) dibandingkan dengan tanpa glutathione. Demikian pula persentase kebuntingan meningkat dari $49,23$ menjadi $59,18\%$ setelah dilakukan inseminasi

dengan menggunakan semen beku yang telah dithawing kembali. Sementara itu, FOOTE *et al.* (2002) menyatakan bahwa penambahan glutathione 0,5 mM dengan atau tanpa superoksida dismutase (SOD) dapat memperbaiki persentase motilitas spermatozoa sapi. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini menggambarkan bahwa antioksidan glutathione pada dosis 0,5 mM dapat mencegah kerusakan sel membran akibat adanya radikal bebas seperti yang diutarakan oleh PARRIS (1998).

Persentase motilitas spermatozoa pada penggunaan antioksidan 0,1% vitamin E pada suhu 5°C berturut-turut adalah 51,4; 40 dan 25% pada penyimpanan 0, 3 dan 7 hari (SITUMORANG *et al.*, 2001 b). Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini maka penggunaan glutathione sedikit lebih baik, karena pada hari ke-0 dan ke-4 masing-masing diperoleh motilitas 73,44 dan 45,62%. Seperti telah dikemukakan bahwa spermatozoa mamalia sangat rentan terhadap peroksidasi lemak, yang dapat menimbulkan kerusakan struktur sel spermatozoa yang pada akhirnya menurunkan metabolisme sel dan motilitas (SINHA *et al.*, 1996). Pada penelitian ini telah digunakan kuning telur 20% (v/v) yang mungkin menyebabkan hasil yang berbeda dengan peneliti terdahulu. SITUMORANG (2002) melaporkan bahwa untuk semen cair (5°C) cukup digunakan kuning telur 10% (v/v) dan untuk semen beku 20% (v/v), dimana pada penelitian tersebut diperoleh persentase motilitas 42 dan 30% masing-masing pada hari ke 3 dan 7. Apabila kuning telur ditingkatkan menjadi 20%, maka diperoleh motilitas 40,5% (hari ke 3) dan 30,5% (hari ke 7). Pada penelitian ini diperoleh motilitas pada hari ke 4 masing-masing sebesar 41,25% (kontrol), 48,75% (0,5 mM),

Tabel 3. Rataan persentase motilitas dan hidup spermatozoa menurut dosis glutathione dan lama penyimpanan semen cair pada suhu 5°C

Lama penyimpanan (hari)	Dosis glutathione (mM)				Rataan
	0,0	0,5	1,0	1,5	
% Motilitas:					
0	71,25±7,19	73,75±8,06	74,38±8,92	74,38±7,27	73,44±7,81 ^a
1	59,37±10,63	64,37±12,09	67,50±11,83	65,00±13,66	64,06±12,18 ^b
4	41,25±10,25	48,75±11,47	48,12±11,09	44,38±12,09	45,62±11,39 ^c
8	15,00±8,16	22,50±7,75	23,75±8,85	20,62±8,54	20,47±8,80 ^d
Rataan	46,72±23,17 ^b	52,34±21,88 ^a	53,44±22,20 ^a	51,09±23,31 ^a	
% Hidup:					
0	73,38±5,44	78,12±5,81	76,37±4,27	74,94±5,14	75,70±5,37 ^a
1	69,19±5,65	73,37±4,48	73,31±6,58	72,12±5,16	72,00±5,65 ^b
4	63,25±4,71	68,12±4,92	68,12±5,58	66,19±6,14	66,42±5,61 ^c
8	48,56±8,42	56,81±7,98	56,75±8,14	54,31±7,79	54,11±8,59 ^d
Rataan	63,59±11,25 ^c	69,11±9,88 ^a	68,64±9,72 ^{ab}	66,89±9,99 ^b	

Huruf berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

48,12% (1 mM), 44,37% (1,5 mM). Hasil penelitian ini sedikit lebih baik bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, dimana terlihat pada hari ke-4 rataan motilitasnya masih lebih tinggi (45,62%) dibandingkan dengan motilitas penelitian terdahulu pada hari ke-3 sebesar 40,5% sebagai yang dilaporkan SITUMORANG (2002).

Pada Tabel 3 terlihat bahwa rataan persentase hidup spermatozoa nyata ($P < 0,01$) menurun dengan bertambah lamanya penyimpanan, masing-masing adalah 75,70; 72,00; 66,42 dan 54,11% untuk semen yang disimpan pada hari ke-0, 1, 4 dan 8. Penambahan glutathione kedalam pengencer ternyata memperbaiki kondisi spermatozoa ($P < 0,01$). Rataan persentase hidup spermatozoa berturut-turut 63,59; 69,11; 68,64 dan 66,89% untuk perlakuan 0,0; 0,5; 1,0 dan 1,5 mM glutathione. Tetapi antara perlakuan B dan C serta antara perlakuan C dan D tidak berbeda nyata ($P > 0,05$), sedangkan antara perlakuan B dan D berbeda nyata ($P < 0,01$). Dari hasil yang dicapai ini, maka penggunaan 0,5 mM glutathione lebih efektif dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Hal tersebut menunjukkan bahwa glutathione dapat mengurangi timbulnya radikal bebas yang dapat menurunkan persentase hidup spermatozoa yang disimpan pada suhu 5°C. Pada penelitian penggunaan antioksidan vitamin E 0,1%, diperoleh persentase hidup sebesar 70,1; 49,7 dan 41,7% untuk penyimpanan pada hari ke-0, 3 dan 7 (SITUMORANG *et al.*, 2001b). Pada penelitian ini terlihat bahwa penambahan antioksidan glutathione lebih efektif dibandingkan dengan 0,1% vitamin E, karena pada hari ke-4 dan 8 didapat persentase hidup spermatozoa masing-masing sebesar 66,42 dan 54,11%. Sedangkan pada penelitian penambahan 0,5 mM phospholipids di dalam pengencer Tris sitrat buffer yang mengandung 10% (v/v) kuning telur diperoleh persentase hidup 55 dan 46% (SITUMORANG, 2002); selanjutnya bila kuning telur ditingkatkan menjadi 20%, maka persentase hidup menjadi 52 dan 47,3%, masing-masing pada hari ke 3 dan ke 7.

Tabel 4 menunjukkan persentase membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa menurut dosis glutathione dan lama penyimpanan semen pada suhu 5°C. Ternyata pemberian glutathione dapat meningkatkan persentase MPU ($P < 0,01$), tetapi antar perlakuan glutathione tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Rataan masing-masing MPU adalah 66,01; 69,75; 68,38 dan 68,44% untuk perlakuan kontrol 0,5; 1,0 dan 1,5 mM glutathione. Berdasarkan hasil penelitian ini, maka persentase MPU maupun TAU menurun ($P < 0,01$) seiring dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan. Dapat dikatakan bahwa penambahan 0,5 mM glutathione cukup efektif mempertahankan membran plasma dari kerusakan akibat adanya radikal bebas. Sedangkan persentase TAU meningkat dengan pemberian glutathione 0,5 mM tetapi kemudian menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi glutathione dalam medium pengencer, namun antar perlakuan 0,5 mM (62,75%) dan 1,0 mM (61,77%) tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Persentase TAU pada masing-masing perlakuan adalah 60,81; 62,75; 61,77 dan 58,73% untuk perlakuan kontrol, 0,5, 1,0 dan 1,5 mM. SINHA *et al.* (1996) melaporkan pada pengencer semen kambing yang berupa Tris, dibandingkan Tris ditambah 2 mM GSH dan Tris ditambah 5 mM GSH terbukti menurunkan abnormalitas pada spermatozoa kambing setelah dibekukan dan dithawing kembali masing-masing 10,10; 8,63 dan 6,98%. Sementara itu SITUMORANG *et al.* (2002) menyatakan bahwa penambahan katalase sebesar 0,025 g/100 ml ke dalam pengencer dapat meningkatkan persentase motilitas akan tetapi penambahan katalase ini menjadi lebih efektif bila ditambahkan bersama-sama dengan 0,5 mM glutathione. Selanjutnya dikatakan bahwa penambahan 0,5 mM glutathione sendiri berpengaruh sama efektif dengan pemberian katalase dan glutathione. Hal ini disebabkan oleh mekanisme perlindungan yang berbeda. Pada umumnya kerusakan membran akrosom terjadi pada tahap terakhir atau pada saat kapasitasi.

Tabel 4. Rataan persentase MPU dan TAU spermatozoa menurut dosis glutathione dan lama penyimpanan semen pada suhu 5°C

Lama penyimpanan (hari)	Dosis glutathione (mM)				Rataan
	0,0	0,5	1,0	1,5	
% MPU:					
0	73,81±4,56	75,25±2,74	76,25±6,00	75,94±5,08	75,31±4,73 ^a
1	70,06±4,99	74,50±3,95	71,31±7,59	72,50±5,27	72,09±5,72 ^b
4	64,94±5,27	69,06±3,92	67,38±6,27	66,50±4,02	66,97±5,07 ^c
8	55,25±5,21	60,19±3,56	58,56±7,89	58,81±5,91	58,20±5,99 ^d
Rataan	66,01±8,56 ^b	69,75±6,99 ^a	68,38±9,44 ^a	68,44±8,24 ^a	
% TAU:					
0	74,31±4,25	75,12±4,67	74,62±5,51	73,62±6,16	74,42± 5,11 ^a
1	69,81±4,21	68,44±4,66	70,06±4,26	68,75±6,07	69,27±4,79 ^b
4	56,87±6,91	61,69±8,33	58,38±6,43	54,25±6,51	57,80±7,43 ^c
8	42,25±8,92	45,75±9,22	44,00±6,37	38,31±9,18	42,58±8,75 ^d
Rataan	60,81±14,04 ^{ab}	62,75±12,96 ^a	61,77±13,18 ^a	58,73±15,52 ^b	

Huruf berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Adanya glutathione maupun katalase yang melindungi membran plasma akrosom, menyebabkan kerusakan tersebut menjadi tertunda atau belum terjadi.

BECONI *et al.* (1993) melaporkan bahwa penambahan antioksidan vitamin E sebanyak 1 mg/ml ke dalam pengencer semen sapi FH dapat mengatasi laju kerusakan membrane plasma dan melindungi membrane plasma terhadap peroksidasi lemak dengan cara melindungi aktifitas enzim superoksida dismutase (SOD) serta mempertahankan metabolisme maupun fungsi sel. Kerusakan membrane plasma antara lain disebabkan oleh beberapa faktor yang mempengaruhinya, seperti: i) ketersediaan nutrisi bagi spermatozoa yang semakin berkurang; ii) lingkungan yang tidak sesuai, seperti halnya suhu rendah; iii) terbentuknya asam laktat yang merupakan sisa metabolisme yang dapat menurunkan pH iv) kemungkinan proses pengenceran dan pendinginan yang kurang tepat; v) terbentuknya reaksi peroksidasi lemak; vi) kualitas semen yang rendah dengan ditemukannya banyak spermatozoa yang abnormal dan vii) terjadinya kerusakan-kerusakan sel. Berdasarkan hasil penelitian ini maka penggunaan 0,5 mM glutathione dalam medium pengencer cukup efektif dalam pembuatan semen cair, karena dapat meningkatkan persentase MPU maupun TAU spermatozoa.

KIM *et al.* (1999) melaporkan bahwa penambahan 1 mM glutathione dalam medium fertilisasi pada proses fertilisasi *in vitro*, menghasilkan blastosis yang berbeda, tergantung pejantan yang digunakan. Pada pejantan yang rendah kapasitas fertilisasinya secara *in vitro*, penambahan 1 mM glutathione menjadi efektif, yang mana persentase blastosis meningkat dari 29,8% (tanpa glutathione) menjadi 39,4%. Hal ini disebabkan adanya peningkatan ROS (*Reactive Oxygen Species*) selama kultur *in vitro* yang dapat menyebabkan kerusakan sel. SIKKA (1996) menyatakan bahwa ROS mempunyai implikasi yang potensial dalam biologi reproduksi, termasuk didalamnya adalah superoksida (O_2^-) anion, hydrogen peroksida (H_2O_2), radikal peroksil (ROO^\cdot), reaktif hidroksil (OH^\cdot), radikal nitrit oksida (NO^\cdot) dan peroksinitrit ($ONOO^\cdot$). Pengaruh (NO^\cdot) tergantung pada konsentrasi dan interaksi dengan hydrogen peroksida. Peningkatan ROS, mengakibatkan kerusakan DNA, protein dan lemak, meningkatkan stres oksida, termasuk peroksidasi lemak, sehingga berakibat pada penurunan motilitas, viabilitas, kapasitas, reaksi akrosom dan fungsi sperma pada umumnya sehingga menurunkan fertilitas

KESIMPULAN

Penambahan glutathione sebanyak 0,5 mM ke dalam pengencer Tris sitrat buffer cukup efektif dalam memperbaiki kondisi membran plasma semen cair yang

disimpan pada suhu 5°C, sehingga dapat meningkatkan persentase motilitas, persentase hidup, keutuhan membran dan tudung akrosom utuh.

Guna membuktikan hasil penelitian ini perlu dilakukan pengkajian lebih mendalam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ir. Ahmad Arifin serta kepada semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BECONI, M.T., C.R. FRANCA, N.G. MORA, and M.A. AFFRANCHINE. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40: 841-851.
- DE MATOS D.G. and C.C. FURNUS. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development. Effect of beta-mercaptoethanol, cystein and cystine. *Theriogenology* 53:761-771.
- FOOTE, P.A., C.C. BROCKET, and M.T. CAPROTH. 2002. Motility and fertility of bull in whole milk extender containing antioxidant. *Anim. Reprod. Sci.* 71:13-23.
- GOLDMAN, E. E., J.E. ELLINGTON, F.B. FARREL, and R. H. FOOTE. 1991. Use of fresh and frozen thawed bull sperm *in vitro*. *Theriogenology* 35:204.
- KARYADI, E. 1997. Antioksidan resep sehat dan umur panjang. <http://www.indonesia.com/intisari/1997/juni/antoux.html>. [Juni 1997].
- KIM, I.H., A. VAN LANGENDONK, A. VAN SOOM, G. VANROOSE, A.L. CASI, P.J.M. HENDRIKSEN, and M.M. BEVERS. 1999. Effect of exogenous glutathione on the *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52:537-547.
- MAXWELL, W.M.C and P.F. WATSON. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.
- PARK, J.E., and J.K. GRAHAM. 1992. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.
- PARRIS M.K. 1998. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. www.thurne.com/altmedrev/full_text/glut.html. 1998.
- SALISBURY, G.W. dan N.L. VAN DEMARK. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada sapi. Terjemahan: R. DJANUAR. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- SAS. 1984. SAS User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1991. Prinsip dan Prosedur Statistika. P.T. Gramedia Utama, Jakarta.

- SINHA, M.P., A.K. SINHA, B. K. SINGH, and R.L. PRUSAD. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci.* 41:237-243.
- SIKKA, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidant in normal and abnormal sperm function. *Frontier in Bioscience* 1,e78-86.
- SITUMORANG, P., E. TRIWULANNINGSIH, A. LUBIS, W. CAROLINE, dan T. SUGIARTI. 2001a. Teknologi penyimpanan semen pada suhu 5°C. Edisi Khusus. Kumpulan Hasil-Hasil Penelitian Peternakan APBN T.A.1999/2000.
- SITUMORANG, P., E. TRIWULANNINGSIH, A. LUBIS, W. CAROLINE, dan T. SUGIARTI. 2001b. Pengaruh phospholipid dan antioxidant terhadap daya hidup spermatozoa setelah dibekukan (*frozen semen*). Kumpulan Hasil-Hasil Penelitian Peternakan APBN T.A.1999/2000.
- SITUMORANG, P., E. TRIWULANNINGSIH, T. SUGIARTI, A. LUBIS, D.A. KUSUMANINGRUM, dan R.G. SIANTURI. 2002. Penyimpanan semen sapi dalam bentuk cair. Laporan Hasil Penelitian. Balai Penelitian Ternak.
- SITUMORANG. 2002. The effect of inclusion of exogenous phospholipids in tris-diluent containing a different level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. *JITV* 7:181-187.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa, Bandung.
- WIJAYA A. 1996. Radikal bebas dan parameter status antioksidan. Forum Diagnostikum No.1. Lab.Klinik prodia
- WHITE, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A Review. *Reprod. Fertil. Dev.*5: 639-658.