

Pengaruh Krioprotektan Gliserol dan Dimetilformamida dalam Pembekuan Semen Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Pengencer Tris Modifikasi

Ariantie OS^{1*}, Yusuf TL², Sajuthi D³, Arifiantini RI²

¹Mahasiswa Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Jln. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, E-mail: Oriza_Ariantie@yahoo.co.id

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi

³Bagian Penyakit Dalam, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,

(Diterima 4 Agustus 2013 ; disetujui 30 Oktober 2013)

ABSTRACT

Ariantie OS, Yusuf TL, Sajuthi D, Arifiantini RI. 2013. Effect of glycerol and dimethylformamide cryoprotectants on buck Etawah Crossbreed frozen semen using modified tris diluents. *JITV* 18(4): 239-250. DOI: 10.14334/jitv.v18i4.327.

A cryoprotectant is component that must be present in a cryopreservation medium to minimize the physical and chemical stresses resulting from the cooling, freezing and thawing of sperm cells. This study was carried out to determine the effect of glycerol (G) and dimethylformamide (DMF) as cryoprotective agent in tris-egg yolk (TEY) trehalose (T) and tris-soya (TS) raffinose (R) diluents. Semen were collected from three sexually mature bucks using artificial vagina, evaluated and divided into four aliquot. Each of them was diluted with TEY supplemented with 50 mM trehalose and TS supplemented with 50 mM raffinose, added with glycerol or DMF 4% (v/v). Diluted semen was packed in minitube straw (100 x 10⁶ sperm/0.25 mL) and equilibrated for 4 hours at 5°C, then freeze in N₂ vapor for 10 minutes in styrofoam box and stored in liquid N₂ container (-196) until further evaluation. Progressive motility, viability and plasma membrane intact were evaluated after thawed at 37°C for 30 seconds factorial experimental design (2 x 2) was used in this study. The sperm motility in TEYTG was significantly higher (65.07±5.38%) compared to TEYTDMF (61.67±5.55%). In contrast sperm diluted with TSRDMF indicated better motility (42.22±8.13%) than TSRG (39.07±5.38%). It was concluded that cryoprotectant had different effect on different diluents.

Key Words: Buck Etawah Crossbreed, Cryoprotectant, Diluent, Frozen Semen

ABSTRAK

Ariantie OS, Yusuf TL, Sajuthi D, Arifiantini RI. 2013. Pengaruh krioprotektan gliserol dan dimetilformamida dalam pembekuan semen kambing peranakan etawah menggunakan pengencer tris modifikasi. *JITV* 18(4): 239-250. DOI: 10.14334/jitv.v18i4.327.

Krioprotektan merupakan komponen yang harus ada dalam medium kriopreservasi yang berfungsi untuk meminimalkan tekanan fisik dan kimia sel spermatozoa yang dihasilkan dari proses pendinginan, pembekuan dan thawing. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penggunaan gliserol (G) dan dimetilformamida (DMF) sebagai agen pelindung dalam pengencer tris-kuning telur (TKT) trehalosa (T) dan tris-soya (TS) raffinosa (R). Semen dikoleksi dari tiga ekor kambing jantan dewasa menggunakan vagina buatan, semen dievaluasi dan dibagi dalam empat bagian. Kemudian diencerkan dengan menggunakan TKT dengan suplementasi trehalosa sebanyak 50 mM dan TS dengan suplementasi rafinosa sebanyak 50 mM, ditambah dengan krioprotektan gliserol atau DMF sebanyak 4% (v/v). Kemudian dikemas dengan straw minitub (100x10⁶ spermatozoa/0,25 mL) dan diekuilibrasi selama 4 jam pada suhu 5°C, kemudian dibekukan dalam uap nitrogen (N₂) cair selama 10 menit dalam kotak styrofoam, dan disimpan dalam kontainer N₂ cair (-196°C) sampai dievaluasi. Motilitas progresif, spermatozoa hidup dan membran plasma utuh dievaluasi setelah thawing pada suhu 37°C selama 30 detik. Rancangan penelitian pola faktorial (2 x 2) digunakan dalam penelitian ini. Motilitas spermatozoa pada TKTTG signifikan lebih tinggi (65,07±5,38%) dibandingkan dengan TKTTDMF (61,67±5,55%). Sedangkan spermatozoa dalam pengencer TSRDMF menunjukkan motilitas yang lebih baik (42,22±8,13%) dibandingkan TSRG (39,07±5,38%). Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa krioprotektan memiliki pengaruh yang berbeda dalam pengencer yang berbeda.

Kata Kunci: Kambing Peranakan Etawah, Krioprotektan, Pengencer, Semen Beku

PENDAHULUAN

Salah satu upaya perbaikan mutu genetik ternak kambing di Indonesia dilakukan melalui pemanfaatan

teknologi Inseminasi Buatan (IB). Namun teknologi IB pada ternak kambing masih kurang diaplikasikan secara luas. Hal ini terkait berbagai kendala diantaranya ketepatan waktu inseminasi, teknik inseminasi dan

kualitas semen beku yang dihasilkan. Kualitas semen beku ditentukan oleh berbagai faktor diantaranya teknik pembekuan, jenis pengencer, jenis dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan. Saat ini semen kambing telah diproduksi oleh beberapa balai inseminasi buatan menggunakan pengencer Tris-kuning telur (TKT).

Penambahan krioprotektan dalam pengencer dapat melindungi spermatozoa dari efek yang mematikan selama proses pembekuan dengan memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium sewaktu pembekuan menjadi lebih kecil sehingga mampu menghambat kerusakan membran sel secara mekanis pada waktu penurunan suhu (*cooling rate*) (Tambing et al. 2000).

Krioprotektan intraseluler gliserol ($C_3H_5(OH)_3$) merupakan komponen utama lipida yang mengandung tiga atom karbon (C) dan tiga gugus OH yang dibentuk melalui lipolisis, yakni disforilasi dan dioksidasi menjadi dihidroksiaseton fosfat dan selanjutnya dihidrolisis menjadi gliseradehida 3-fosfat (Voet et al. 1999). Penambahan gliserol ke dalam pengencer semen beku dapat meningkatkan daya tahan spermatozoa. Efek lain gliserol adalah mencegah pengumpulan molekul H_2O dan mencegah kristalisasi es pada daerah titik beku larutan. Gliserol akan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan akan digunakan untuk aktivitas metabolisme oksidatif, menggantikan sebagian air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit, menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya rusaknya terhadap spermatozoa dengan jalan memodifisir kristal-kristal es yang terbentuk (Tambing et al. 2000).

Gliserol telah menjadi krioprotektan yang paling banyak digunakan untuk pembekuan semen (Leboeuf et al. 2000). Namun demikian amida juga telah menunjukkan potensi yang baik sebagai krioprotektan, karena memiliki toksisitas dan viskositas yang lebih rendah dan memiliki bobot molekul yang rendah pula (Medeiros et al. 2002). Bezerra et al. (2011) menyatakan bahwa amida memiliki toksisitas yang lebih rendah dan dapat menjaga integritas akrosom. Amida telah diusulkan sebagai krioprotektan alternatif untuk pembekuan semen, terutama untuk semen dari pejantan yang lebih sensitif terhadap efek racun dari gliserol karena amida memiliki bobot molekul (73,09) dan viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan gliserol (dengan bobot molekul 92,05) dan untuk permeabilitas membran yang lebih tinggi sehingga dapat mengurangi kemungkinan kerusakan sel yang disebabkan oleh tekanan osmotik. Selain itu penambahan metil (CH_3) kedalam molekul amida dapat meningkatkan permeabilitas membran sperma dan meningkatkan efisiensi kriopreservasi.

Dimethylformamida (DMF) merupakan derivat acyl dan mempunyai rumus struktur $(CH_3)_2NCHO$. Acyl terdiri atas sepasang grup fungsional dimana sebuah

karbonil bergabung dengan oksigen, halogen, sulfur atau atom elektronegatif lainnya. Derivat acyl yang penting adalah asam klorida, ester dan amida yang mendekati struktur asam karboksilat. N,N dimethylformamida adalah amida yang dihasilkan N-alkil tersubstitusi atau N, N-dialkil tersubstitusi, dan amida relatif stabil terhadap air (Fessenden & Fessenden 2006). Dijelaskan lebih lanjut oleh Fessenden & Fessenden (2006), DMF merupakan pelarut aprotik polar, polar berarti mengutub dimana satu atom mempunyai keelektronegatifan yang substansial lebih besar dari atom lainnya. Semakin elektronegatif suatu atom, semakin besar tarikannya terhadap elektron sehingga tidak cukup bagi atom untuk memecahkannya menjadi ion. Atom ini mempunyai bagian elektron yang besar dan menghasilkan suatu ikatan dengan distribusi elektron yang tidak merata.

DMF digolongkan sebagai senyawa amida dan memiliki sifat basa lemah (Bixara 2009). DMF merupakan pelarut aprotik polar yang digunakan dalam pembekuan kering. Pelarut aprotik polar adalah pelarut yang tidak memiliki proton untuk ikatan hidrogen pada inti dan akan melarutkan lebih banyak kation daripada anion. Dengan demikian anion tersebut kurang terikat oleh molekul pelarut dan lebih banyak tersedia untuk reaksi, sehingga semakin polar suatu pelarut maka energi aktivasi untuk ionisasi akan semakin rendah dan derajat reaksinya akan semakin cepat (Alvarenga et al. 2005). DMF merupakan salah satu *cryoprotectant agent* (CPA) dengan konstanta dielektrik yang tinggi (Best 2011). Konstanta dielektrik merupakan suatu ukuran kemampuan zat untuk memisahkan daya tarik antara partikel bermuatan listrik yang berlawanan (Best 2011). DMF mempunyai kemampuan yang baik untuk melindungi sel terhadap pembekuan (Medeiros et al. 2002). DMF dapat digunakan sebagai krioprotektan alternatif dalam pembekuan semen kambing (Bezerra et al. 2011). Akan tetapi, mekanisme DMF untuk pembekuan semen kambing belum banyak dilaporkan.

Rendahnya kualitas semen diduga akibat keberadaan enzim *Phospholipase A* yang disebut juga *egg yolk coagulating enzyme* yang ada di dalam *bulbourethral gland secretion* (BUS) yang terkandung dalam plasma semen kambing (Paulenz et al. 2005). Enzim ini dapat menghidrolisis fosfolipid dari kuning telur menjadi *lysophospholipid* seperti *lysolecithin* yang toksik pada spermatozoa dan dapat menyebabkan reaksi akrosom dini sehingga spermatozoa lebih cepat rusak. Sementara itu kuning telur dan susu mengandung fosfolipid dalam pengencer yang sangat dibutuhkan karena melindungi spermatozoa dari *cold shock* pada saat pendinginan ataupun pembekuan (Amirat et al. 2004). Sehingga kuning telur yang sudah lazim ditambahkan kedalam pengencer, dibandingkan dengan soya karena soya diperkirakan dapat menyamai fungsi dari kuning telur.

Kuning telur merupakan produk hewan yang memungkinkan dapat menularkan bibit penyakit sehingga mempengaruhi kualitas spermatozoa.

Oleh karena itu dicari alternatif pengganti kuning telur, yakni lesitin yang berasal dari tumbuhan antara lain berupa soya lesitin. Penggunaan fosfolipid dari soya ini telah dimulai sejak tahun 2000an oleh perusahaan komersial yang bergerak dibidang IB dan produk tersebut telah dijual di pasaran dengan beberapa merek seperti Biociphos (IMV, L'Aigle, France) dan Andromed (Minitub, Germany). Dengan dihilangkannya kandungan kuning telur dan susu maka terhindar dari isu adanya bahaya biologis dan bakteri yang dapat mempengaruhi kualitas spermatozoa. Pengencer tersebut meskipun diperuntukkan untuk ternak sapi, namun tidak menutup kemungkinan untuk diaplikasikan dalam preservasi semen kambing. Sedangkan informasi mengenai pengencer yang mengandung ekstrak kacang kedelai untuk preservasi semen kambing belum banyak diketahui.

Fruktosa dan glukosa merupakan karbohidrat (monosakarida) yang umum diberikan pada pengencer semen cair maupun semen beku pada berbagai ternak. Karbohidrat dapat berfungsi ganda dimana karbohidrat sederhana seperti glukosa dan fruktosa dibutuhkan sebagai sumber energi, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Souhoka et al. 2009). Trehalosa (disakarida) menghasilkan 2 molekul glukosa. Sedangkan rafinosa (trisakarida) menghasilkan masing-masing 1 molekul galaktosa, glukosa dan fruktosa. Trehalosa dan rafinosa dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama. Penggunaan disakarida (trehalosa), trisakarida (rafinosa) dan oligosakarida pada pengencer semen beberapa ternak diduga lebih mampu melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan (Molinia et al. 1994; Yildiz et al. 2000). Penggunaan trehalosa dan *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) pada pembuatan semen beku domba dilaporkan dapat meningkatkan persentase motilitas spermatozoa dibandingkan dengan hanya menggunakan fruktosa (Aisen et al. 2000).

Dari uraian di atas dilakukan penelitian mengenai pengaruh krioprotektan gliserol dan DMF dalam pembekuan semen kambing Peranakan Etawah menggunakan pengencer tris-kuning telur trehalosa dan tris-soya rafinosa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penggunaan gliserol dan DMF sebagai krioprotektan untuk pengencer tris-kuning telur

trehalosa dan tris-soya rafinosa yang digunakan dalam mengoptimalkan pembekuan semen.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR), Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor dan Koperasi Kambing Perah, Cikarawang, Bogor. Penelitian ini dilakukan pada bulan November 2011 sampai dengan April 2012.

Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan diperlakukan sesuai dengan etika penelitian. Hewan yang dipergunakan sebagai sumber semen adalah tiga ekor kambing jantan dewasa Peranakan Etawah (PE) dengan umur berkisar antara 2-3,5 tahun dengan bobot badan 40-50 kg. Ternak ditempatkan dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa hijauan rumput gajah segar 20% per bobot badan dan konsentrat 2% per bobot badan dengan pemberian dua kali dalam sehari, serta air minum yang diberikan secara *ad libitum*.

Syarat pejantan yang digunakan, yakni memiliki kualitas semen yang baik, dengan kriteria: motilitas lebih dari 70%, konsentrasi lebih dari 2500×10^6 /mL dan abnormalitas tidak lebih dari 10%.

Persiapan media pengencer

Pengencer tris-kuning telur dan tris-soya menggunakan dasar pengencer tris-buffer. Pembuatan tris-buffer mengandung 2,98 g Tris-hydroxymethyl-aminomethane, 1,65 g asam sitrat monohidrat dan 2 g D-fruktosa. Ketiga bahan tersebut dilarutkan dalam 100 mL milli-Q water. Pengencer tris-soya terdiri atas 2,5% sari kedelai (Melilea) dilarutkan dalam tris-buffer, sedangkan pengencer tris-kuning telur terdiri atas 20% kuning telur dilarutkan dalam tris-buffer kemudian kedua pengencer tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan $447 \times g$ dan bagian supernatannya diambil dan digunakan sebagai pengencer. Krioprotektan gliserol dan DMF sebanyak 4% (v/v) dimasukkan dalam pengencer tris-soya disuplementasikan dengan rafinosa sebanyak 50 mM dan tris-kuning telur disuplementasikan trehalosa sebanyak 50 mM (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi bahan pengencer semen beku dengan krioprotektan dimetilformamida dan gliserol dalam pengencer tris modifikasi

Komposisi	Pengencer			
	Dimetilformamida		Gliserol	
	TKT Trehalosa	TS Rafinosa	TKT Trehalosa	TS Rafinosa
Tris Buffer (mL)	7,6	7,6		
Gliserol (mL)			0,4	0,4
DMF (mL)	0,4	0,4		
Kuning telur (mL)	2		2	
Sari kedelai (soya)		0,25		0,25
Trehalosa (g)	0,17		0,17	
Rafinosa (g)		0,29		0,29
Total (g/mL)			10	10
Total (mL/mL)	10	10		
Penisilin (IU/mL)	1000	1000	1000	1000
Streptomisin (mg/mL)	1	1	1	1
Osmolaritas (mOsm/kg)	860	700	1210	1220
pH	6,40	6,40	6,40	6,40

DMF = Dimetilformamida; TKT = Tris-kuning telur; TS = Tris-soya

Koleksi dan evaluasi semen

Penampungan semen dilakukan dengan menggunakan vagina buatan satu kali dalam seminggu dengan tiga kali penampungan masing-masing terdiri dari dua ejakulat (dua kali penampungan dalam satu periode penampungan).

Evaluasi semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis mencakup volume, warna, konsistensi dan pH.

1. Volume: diukur menggunakan pipet pengukur
2. Derajat keasamaan (pH), diukur menggunakan indikator pH
3. Konsistensi: dibedakan antara kental dan sedang
4. Warna: dibedakan menjadi krem dan putih susu.

Kriteria kualitas semen yang baik adalah konsistensi kental dan berwarna krem.

Evaluasi secara mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, konsentrasi, spermatozoa hidup, morfologi abnormalitas dan membran plasma utuh (MPU).

1. Gerakan massa: dibedakan berdasarkan kecepatan berpindahannya gerakan sperma dengan klasifikasi sangat baik (+++) dan baik (++)
2. Motilitas spermatozoa: persentase gerakan progresif individu dengan kriteria sangat baik ($\geq 90\%$), baik (70-85%) dan sedang (< 60-70%).

3. Konsentrasi spermatozoa: menggunakan larutan *formolsaline* menurut Arifiantini (2006) yaitu 6,19 g disodium hidrogen fosfat dihidrat, 3,54 g potassium dihidrogen fosfat, 5,41 g sodium klorida dan 125 mL larutan formaldehid (37%) dilarutkan dengan aquadest 875 mL. Sebanyak 998 μL larutan *formolsaline* ditambahkan dengan 2 μL semen. Jumlah spermatozoa per mL dihitung dengan menggunakan kamar hitung *neubauer*, hasilnya dikalikan 10^6 jumlah dari 5 kotak.

4. Persentase spermatozoa hidup: menggunakan zat warna eosin-nigrosin menurut Barth & Oko (1989) yaitu 20 g nigrosin dan 1,5 g sodium sitrat dilarutkan dalam 300 mL *distilled water* distirer dan dihangatkan sampai larut ditambahkan 3,3 g eosin yellow pH disesuaikan sampai 6,8-7,0. Larutan dibiarkan beberapa hari dan disaring sebelum digunakan. Spermatozoa dihitung minimal 200 sel berdasarkan perhitungan dari kira-kira 10 lapang pandang. Sperma yang hidup berwarna transparan dan yang mati berwarna merah pada bagian kepala.

Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa: menggunakan larutan *hypoosmotic swelling test* (HOS-test) yang dikembangkan oleh Revell & Mrode (1994) yaitu 7,35 g natrium sitrat dan 13,52 g fruktosa dilarutkan dalam 1000 mL *distilled water*. Sebanyak 1 mL larutan hipoosmotik ditambah dengan 5 μL semen,

kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Membran plasma utuh ditandai dengan ekor spermatozoa yang melingkar dan membran yang tidak utuh ditandai dengan ekor yang lurus. Spermatozoa dihitung minimal 200 sel berdasarkan perhitungan kira-kira dari 10 lapang pandang.

Morfologi abnormalitas spermatozoa: dievaluasi dengan pewarnaan Williams menggunakan carbo-fuchin menurut Arifiantini et al. (2006) yaitu dua bagian larutan basic fuchsin dalam larutan phenol (10 mL larutan basic fuchsin (10 g basic fuchsin dalam 100 mL alkohol 95%) dan 170 mL larutan phenol 5%) dan satu bagian larutan saturated bluish eosin alkohol 95% dibiarkan selama 14 hari dan disaring sebelum digunakan. Semen segar yang dikoleksi dilarutkan dengan NaCl fisiologis, lalu dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek dan dikeringudarkan. Pewarnaan dilakukan dengan cara memfiksasi preparat ulas dari semen segar yang dikoleksi dengan *heating table* dan selanjutnya dicuci dalam alkohol *absolute* selama 4 menit. Biarkan sampai kering. Preparat dimasukkan kedalam larutan 0,5% *chloramin* selama 1-2 menit, sambil diangkat dan dimasukkan kembali berkali-kali dengan tujuan menghilangkan mukus dan ulasan terlihat jernih. Kemudian dicuci dalam *distilled water* selanjutnya masukan kedalam alkohol 95% dan diwarnai dengan larutan Williams selama 8-10 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Penilaian dilakukan terhadap abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Spermatozoa dihitung minimal 200 sel berdasarkan perhitungan kira-kira 10 lapang pandang.

Kriopreservasi semen

Syarat kualitas semen dibekukan adalah motilitas spermatozoa lebih dari 70%, konsentrasi lebih dari 2500 x 10⁶/mL dan abnormalitas tidak lebih dari 10%.

Metode pembekuan dilakukan satu tahap. Pembekuan semen dibuat dengan dosis per straw minitub (0,25 mL) dengan konsentrasi 100 x 10⁶ spermatozoa/ 0,25 mL. Kemudian straw yang berisi semen diekuilibrasikan pada lemari es pada temperatur 5°C selama empat jam. Setelah ekuilibrasikan, semen dalam straw diletakkan pada rak pembekuan dengan jarak 3 cm diatas permukaan uap nitrogen (N₂) cair selama 10 menit dengan menggunakan kotak styrofoam. Semen beku tersebut disimpan dalam kontainer N₂ cair (-196°C) sampai dilakukan evaluasi.

Kualitas semen hasil pembekuan diketahui dengan cara melakukan pencairan kembali (*thawing*) dengan air hangat bersuhu 37°C selama 30 detik, dengan melihat persentase motilitas progresif, persentase hidup dan membran plasma utuh dari spermatozoa.

Keberhasilan pembekuan juga dinilai dari *recovery rate* (RR) yaitu jumlah spermatozoa yang berhasil pulih

dari proses pembekuan yang dihitung menurut Hafez & Hafez (2000) dengan rumus:

$$RR = \frac{A}{B} \times 100\%$$

RR = Recovery rate

A = Jumlah motilitas spermatozoa progresif setelah thawing

B = Jumlah motilitas spermatozoa progresif semen segar

Rancangan penelitian dan analisis data

Penelitian dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola factorial (2 x 2). Setiap perlakuan (2 pengencer x 2 krioprotektan) terdiri dari tiga ulangan (semu dari tiga ekor kambing Peranakan Etawah (PE) jantan dan setiap ulangan terdiri dari tiga sampel semen). Data penelitian dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA), jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan sesuai petunjuk Steel & Torrie (1995). Data diolah menggunakan program SPSS versi 15.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas semen segar

Semen segar dari ketiga jantan yang digunakan mempunyai kualitas baik, secara makroskopis semen berwarna krem dengan konsistensi kental. Kekentalan dan warna menginterpretasikan bahwa konsentrasi spermatozoa tinggi. Terbukti bahwa dalam pemeriksaan mikroskopis bahwa konsentrasi spermatozoa adalah 3686,11 ± 553,56 x 10⁶ spermatozoa/mL. Hasil tersebut cenderung sama dibandingkan hasil Dorado et al. (2010) sebesar 3720±100x10⁶ spermatozoa/mL, dan lebih tinggi dibandingkan dengan hasil Bezerra et al. (2011) yakni 2400±200x10⁶ spermatozoa/mL. Demikian pula hasil pemeriksaan yang didapatkan dari motilitas spermatozoa yaitu 77,78±2,64%, persentase spermatozoa hidup 84,90±4,37% dan persentase membran plasma utuh 77,01±3,18% (Tabel 2).

Hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa yang didapat lebih rendah dibandingkan dengan hasil Dorado et al. (2010) yakni 94,06±0,71%. Namun demikian hasil tersebut masih memenuhi syarat untuk pengolahan semen selanjutnya. Dinyatakan oleh Ax et al. (2000) bahwa persentase progresif motilitas spermatozoa normal agar dapat diolah lebih lanjut berkisar antara 70-90%. Hasil pemeriksaan spermatozoa hidup yang diidentifikasi dengan warna transparan pada bagian kepala spermatozoa didapatkan 84,90±4,37% hasil tersebut relatif sama dibandingkan dengan hasil

penelitian Taming et al. (2001) yakni 82,54%. Persentase spermatozoa hidup lebih tinggi dari pada spermatozoa motil karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semuanya motil progresif (Kostaman & Sutama 2006).

Tabel 2. Rataan nilai karakteristik semen segar kambing Peranakan Etawah

Karakteristik semen	Rataan
Makroskopis	
Volume (mL)	1,44±0,15
Warna	krem
pH	6,60±0,15
Konsistensi	kental
Mikroskopis	
Gerakan massa	+++
Gerakan individu	
Motilitas (%)	77,78±2,64
Skor individu	4,89±0,33
Hidup (%)	84,90±4,37
Konsentrasi (106/mL)	3686,11±553,56
Abnormalitas (%)	8,62±3,05
Membran plasma utuh (%)	77,01±3,18

+++ (baik): terlihat gelombang cepat dan banyak

Kualitas spermatozoa juga dapat diukur dengan mengetahui keutuhan dari membran yang berfungsi untuk melihat fungsi spermatozoa masih hidup atau tidak. Hasil pemeriksaan membran plasma utuh (MPU) yang didapatkan 77,01±3,18%, hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan hasil Souhoka et al. (2009) yaitu 84,00±1,00%. Secara fisiologis terdapat hubungan antara membran plasma utuh dengan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Apabila terjadi kerusakan pada membran plasma dapat menyebabkan hilangnya enzim-enzim yang diperlukan dalam proses metabolisme sehingga tidak dihasilkan energi sehingga motilitas menjadi rendah, serta daya hidup juga akan rendah (Rizal et al. 2003). Beberapa hal yang dapat mempengaruhi perbedaan kualitas spermatozoa secara keseluruhan antara lain faktor individu, pakan, lingkungan, teknik dan frekuensi koleksi semen, serta kondisi media pengencer diantaranya pH dan tekanan osmotik.

Ditinjau dari abnormalitas spermatozoa hasil penelitian yang didapat yakni 8,62±3,05%. Abnormalitas yang didapatkan lebih rendah dibandingkan dengan hasil Bezerra et al. (2011) yakni 23,90±1,70%. Ax et al. (2000) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa tidak lebih dari 10%.

Pengukuran abnormalitas spermatozoa penting dilakukan sebab abnormalitas yang tinggi akan mengganggu fertilitas jantan secara umum, hal tersebut diungkapkan oleh Garner & Hafez (2000) yang menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa akan memengaruhi fertilitas jika jumlahnya melebihi 20% dari total spermatozoa.

Abnormalitas yang didapat kebanyakan adalah abnormalitas primer dengan rata-rata 1,18±0,57% dan abnormalitas sekunder 7,44±1,85%. Beberapa abnormalitas primer yang terlihat pada penelitian adalah *double head*, *detached head*, *abaxial*, *microcephalus*, *macrocephalus*, *narrow* dan *pear shaped*. Sedangkan abnormalitas sekunder yang terlihat adalah *teratoid forms*, *bowed midpiece*, *coiled principal piece*, *proximal droplet*, *bent principal piece*, *pseudodroplet* dan *distal droplet*.

Abnormalitas primer merupakan ketidaknormalan morfologi spermatozoa yang terjadi ketika spermatozoa masih di dalam tubuli seminiferi (spermatogenesis). Kelompok abnormalitas ini lebih berbahaya karena sebagian bersifat genetik sebagai contoh *knobbed acrosome defect* yang dapat menurunkan fertilitas sehingga mempengaruhi keberhasilan inseminasi buatan. Semen dengan persentase abnormalitas cukup tinggi cenderung memiliki fertilitas yang rendah karena berkaitan dengan kemampuan mengawali fertilisasi atau memelihara perkembangan embrio. Abnormalitas sekunder merupakan ketidaknormalan morfologi spermatozoa yang terjadi selama spermatozoa melewati saluran reproduksi. Sedangkan abnormalitas tersier merupakan ketidaknormalan morfologi spermatozoa yang terjadi karena perlakuan atau penanganan pada saat penampungan.

Pengaruh krioprotektan Gliserol dan DMF dalam Kriopreservasi semen menggunakan pengencer tris-kuning telur trehalosa dan tris-soya rafinosa

Kualitas semen setelah pengenceran dari berbagai macam perlakuan cenderung sama dengan kualitas semen segar dan tidak terdapat adanya perbedaan antar perlakuan ($P > 0,05$). Gliserol dan DMF yang digunakan sebagai krioprotektan dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa dan tris-soya rafinosa mampu memberikan perlindungan bagi spermatozoa pada awal penyimpanan. Akan tetapi, kualitas semen setelah pengenceran sampai proses ekuilibrasi (selama 4 jam) mengalami sedikit penurunan yaitu 1,69%-2,24% tetapi tidak terdapat adanya perbedaan antar perlakuan ($P > 0,05$). Penurunan kualitas semen setelah pengenceran sampai proses ekuilibrasi dapat dipahami mengingat terjadinya perubahan dari suhu ruang (28°C) ke suhu lemari es (5°C). Lemari es relatif stabil di suhu 5°C dan kandungan lesitin (*phosphatidyl choline*) yang ada dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa dan

tris-soya rafinosa dengan penambahan gliserol dan DMF cukup memberikan perlindungan bagi spermatozoa akibat penurunan suhu karena lesitin (*phosphatidyl choline*) dapat bersifat membran coating untuk tetap mempertahankan konfigurasi normal *phospholipid bilayer* yang merupakan susunan utama membran sel spermatozoa.

Evaluasi kualitas semen setelah *thawing* dari hasil pengenceran mengalami penurunan. Krioprotektan gliserol dan DMF dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa menurun sebanyak 11,60% dan 15,00% lebih baik dibandingkan dengan tris-soya rafinosa dengan krioprotektan yang sama dengan penurunan sebanyak 34,45% dan 37,60% ($P < 0,05$) dan terdapat perbedaan antar perlakuan dengan menggunakan gliserol maupun DMF baik dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa dan tris-soya rafinosa ($P < 0,05$). Hasil evaluasi semen setelah *thawing* dengan menggunakan gliserol dan DMF dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa kualitas semen mengalami penurunan 11,60% dan 15,00% lebih baik jika dibandingkan dengan hasil Tambing et al. (2000) yaitu 17,51% sampai 24,81% dan Dorado et al. (2010) yaitu 28,00%. Sementara itu, pada pengencer tris-soya dengan krioprotektan yang sama penurunan kualitas semen tinggi yaitu sebanyak 34,45% dan 37,60%. Perubahan suhu yang sangat drastis dari suhu setelah pengenceran (28 °C) ke suhu pembekuan dalam N₂ cair (-196°C) sampai ke suhu setelah *thawing* (37°C) yang menyebabkan spermatozoa mengalami kerusakan pada membran sel sehingga motilitas spermatozoa terganggu dan menyebabkan kematian sel spermatozoa yang cukup tinggi. Apabila terjadi kerusakan pada membran plasma dapat menyebabkan hilangnya enzim-enzim yang diperlukan dalam proses metabolisme sehingga tidak dihasilkan energi sehingga motilitas menjadi rendah, serta daya hidup juga akan rendah (Rizal et al. 2003).

Kualitas semen beku setelah *thawing* pada penelitian cukup tinggi. Motilitas spermatozoa dengan menggunakan krioprotektan gliserol dalam tris-kuning telur trehalosa menunjukkan peranan yang lebih baik (65,07±5,38%) dengan nilai *recovery rate* (83,65%) yang lebih tinggi dibandingkan dengan DMF dalam tris-kuning telur trehalosa (61,67±5,55%) dengan nilai *recovery rate* (79,29%) ($P > 0,05$) (Tabel 3). Dengan demikian gliserol maupun DMF tidak memiliki pengaruh yang berbeda terhadap penambahan tris-kuning telur trehalosa, akan tetapi gliserol cenderung lebih baik sekitar 3%. Hal ini diduga karena gliserol yang ada dalam tris-kuning telur trehalosa memiliki kemampuan untuk mencegah terbentuknya kristal-kristal es akibat dehidrasi sel yang berlebihan dari dalam sel dan menstabilkan membran plasma sel sehingga dapat melindungi kerusakan fisik maupun fungsional spermatozoa selama proses pembekuan dan memodifikasi struktur kristal es sehingga tidak merusak

organel-organel sel. Peranan lain dari gliserol adalah dapat mencegah dehidrasi karena memiliki tiga gugus hidroksil (-OH) yang memiliki daya pengikat air yang kuat dan tiap gugus hidroksil ini dapat mengadakan interaksi dengan gugus karboksil asam lemak (Kimball 1998). Gliserol dalam melindungi membran sel akan mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga mengurangi ketidakstabilan membran dan dapat berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein (Parks & Graham 1992).

Selain gliserol penambahan kuning telur pada pengencer juga mampu memberikan efek perlindungan pada spermatozoa selama proses pendinginan dan pembekuan. Fraksi protein non dialisis pada kuning telur yang mengakibatkan kuning telur dapat mempunyai sifat proteksi yang sangat baik pada spermatozoa kambing selama pembekuan. Selain itu diduga karena adanya kaitan yang erat antara *low-density lipoprotein* dengan membran plasma sperma seperti yang ditemukan pada spermatozoa sapi (Molinia et al. 1994). Selain itu, penambahan trehalosa lebih mampu memberikan perlindungan terhadap pengaruh pembekuan (Aisen et al. 2000), meningkatkan integritas membran dan viabilitas sel spermatozoa (Aisen et al. 2002). Trehalosa (C₁₂H₂₂O₁₁) yang merupakan gula nonpereduksi golongan disakarida (α -D-glukopiranosil-(1→1)- α -D-glukopiranosida) dari dua molekul glukosa yang terikat melalui ikatan α -1,1 dan mengandung antioksidan (Best 2011), Trehalosa bukan merupakan gula pereduksi, karena 2 atom karbon anomerik berikatan satu sama lain.

Higashiyama (2002) menyatakan bahwa trehalosa adalah salah satu sakarida yang memiliki struktur yang paling stabil dan berperan dalam menstabilkan membran sel sehingga bersama-sama tris-kuning telur menunjukkan kemampuan yang optimal dalam melindungi sel. Dijelaskan lebih lanjut bahwa trehalosa merupakan gula nonpereduksi dan berfungsi sebagai antioksidan sehingga tris-kuning telur yang disuplementasikan dengan trehalosa tidak mudah teroksidasi dan membran sel spermatozoa tidak mudah rusak. Crowe & Crowe (2000) menjelaskan bahwa trehalosa bersifat krioprotektan ekstraseluler yang bekerja menstabilkan membran dan melindungi membran selama proses pembekuan, sehingga jika dikombinasikan dengan gliserol menunjukkan kemampuan yang optimal dalam melindungi sel terhadap efek pembekuan. Trehalosa adalah gula yang tidak toksik dan bersifat krioprotektan dengan cara menggantikan atau berasosiasi dengan *bound water*, dan trehalosa dapat melindungi membran sel dengan cara mengikat air ke protein dan ke ujung polar dari fosfolipid pada membran sel lebih kuat dibandingkan dengan *bound water* tanpa tambahan trehalosa (*bound water* saja) (Best 2011).

Tabel 3. Pengaruh dimetilformamida (DMF) dan gliserol sebagai krioprotektan dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa dan tris-soya rafinosa terhadap kualitas spermatozoa

Tahapan pembekuan	Tris-kuning telur trehalosa		Tris-soya rafinosa		Rataan	
	DMF	Gliserol	DMF	Gliserol	Tris-kuning telur trehalosa	Tris-soya rafinosa
Semen segar						
SM (%)	77,78±2,64 ^{aM}	77,78±2,64 ^{aM}	77,78±2,64 ^{aM}	77,78±2,64 ^{aM}	77,78	77,78
SH (%)	84,90±4,37 ^{aM}	84,90±4,37 ^{aM}	84,90±4,37 ^{aM}	84,90±4,37 ^{aM}	84,90	84,90
MPU (%)	77,01±3,18 ^{aM}	77,01±3,18 ^{aM}	77,01±3,18 ^{aM}	77,01±3,18 ^{aM}	77,01	77,01
Setelah pengenceran						
SM (%)	76,67±2,50 ^{aM}	76,67±2,50 ^{aM}	76,67±2,50 ^{aM}	76,67±2,50 ^{aM}	76,67	76,67
SH (%)	83,23±4,23 ^{aM}	84,55±3,28 ^{aM}	84,62±3,66 ^{aM}	82,88±3,45 ^{aM}	83,89	83,75
MPU (%)	75,45±3,20 ^{aM}	76,12±3,19 ^{aM}	75,67±3,11 ^{aM}	75,45±3,19 ^{aM}	75,79	75,56
Setelah ekulibrasi						
SM (%)	74,43±2,50 ^{aM}	74,55±2,50 ^{aM}	74,73±2,50 ^{aM}	74,98±2,64 ^{aM}	74,49	74,31
SH (%)	80,00±3,25 ^{aM}	81,04±3,67 ^{aM}	82,01±3,52 ^{aM}	81,11±3,19 ^{aM}	80,52	81,56
MPU (%)	72,66±3,20 ^{aM}	72,87±3,33 ^{aM}	73,46±2,66 ^{aM}	72,50±3,74 ^{aM}	72,77	72,98
Setelah thawing						
SM (%)	61,67±5,55 ^{aN}	65,07±5,38 ^{aN}	42,22±8,13 ^{eN}	39,07±5,38 ^{eN}	63,37	40,65
SH (%)	65,57±4,16 ^{aN}	68,98±4,68 ^{aN}	48,89±7,93 ^{eN}	45,36±4,81 ^{eN}	67,28	47,13
MPU (%)	64,58±5,70 ^{aN}	69,19±3,36 ^{eN}	41,44±3,99 ^{iN}	41,32±5,71 ^{iN}	66,89	41,38
Recovery rate (%)	79,29	83,65	54,28	50,23	81,47	52,26

Huruf vokal (a, e, i) berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama dan huruf konsonan (M, N) berbeda yang mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P < 0,05)

DMF = Dimetilformamida
 SM = Spermatozoa motil
 SH = Spermatozoa hidup
 MPU = Membran plasma utuh

Menurut Watson (2000) selama tahapan pembekuan, sel sperma melewati perubahan drastis dalam lingkungan fisik dan kimia. Suhu turun mendekati titik beku air yang menyebabkan perubahan struktural lipid bilayer mengubah membran plasma. Perubahan ini dapat memicu perubahan dalam permeabilitas membran plasma yang dapat menyebabkan pecahnya sel sperma (Hermansson & Linde-Forsberg 2006).

Hafez (2000) menyatakan bahwa gliserol yang digunakan sebagai krioprotektan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan oleh spermatozoa dipakai untuk metabolisme oksidatif, menggantikan air bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit, menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler serta mengurangi daya rusaknya terhadap sel spermatozoa. Efek gliserol adalah mencegah pengumpulan molekul H₂O dan mencegah kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (Mazur 1984). Selain

itu, gliserol akan menurunkan konsentrasi natrium di dalam medium di luar sel sehingga kematian sel spermatozoa akibat *solution-effect* dapat dihindarkan dan pembentukan kristal-kristal es di dalam sel dapat dikurangi. Mekanisme kerjanya adalah dengan jalan mengubah bentuk dan ukuran kristal es yang terbentuk sehingga mengurangi tekanan mekanik dan menurunkan titik beku medium sehingga kristal-kristal es tidak terbentuk. *Solution-effect ini* akan timbul bila terjadi perubahan yang drastis dari larutan dalam sel yang dibekukan sebagai akibat terbentuknya kristal-kristal es di luar dan dalam sel spermatozoa. Selain itu terjadi penurunan volume air dalam sel, perubahan air menjadi es dan adanya peningkatan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel. Dengan adanya gliserol dalam medium pengencer diharapkan peningkatan konsentrasi elektrolit yang merugikan dapat dihindarkan (Tambing et al. 2000).

Krioprotektan DMF dalam pengencer tris-soya rafinosa lebih memperkuat daya kerja tris-soya rafinosa dengan persentase motilitas spermatozoa ($42,22 \pm 8,13\%$) dengan nilai *recovery rate* ($54,28\%$) yang lebih tinggi dibandingkan dengan gliserol dalam pengencer yang sama ($39,07 \pm 5,38\%$) dengan nilai *recovery rate* sebesar $50,23\%$ ($P > 0,05$) (Tabel 3). Dengan demikian DMF maupun gliserol tidak memiliki pengaruh yang berbeda terhadap penambahan tris-soya rafinosa, akan tetapi DMF cenderung lebih baik sekitar 5% . Hal ini dikarenakan kandungan asam amino (seperti asam aspartat, asam glutamat, serin, prolin, valin, isoleusin, leusin, phenilalanin dan lisin) yang ada didalam tris-soya rafinosa yang dapat membentuk ikatan hidrogen yang ada pada DMF. Jadi, atom hidrogen yang ada pada DMF berikatan atau mengelilingi asam amino yang ada pada tris-soya rafinosa. Oleh karena itu, krioprotektan DMF lebih memperkuat daya kerja tris-soya rafinosa. Wade (2000) menjelaskan bahwa DMF yang merupakan pelarut yang bersifat polar aprotik (tidak mempunyai atom -H untuk ikatan hidrogen) dengan konstanta dielektrik dan moment dipol yang tinggi. Jadi meskipun DMF melarutkan tidak bekerja membentuk ikatan hidrogen dengan anion. DMF dapat melarutkan garam-garam terutama melalui kation larutan melalui daya tarik pada ujung dipol C=O. Ujung positif dari dipol dilindungi di dalam molekul dan dapat melarutkan anion tetapi sangat lemah. Pine et al. (1988) menjelaskan bahwa amida dapat dengan mudah terbentuk dari senyawa yang sesuai yang memiliki gugus amino dan gugus karboksilat. Oleh karena itu amida mudah bereaksi dengan asam karboksilat di dalam reaksi asam-basa sehingga menghasilkan garam amonium. (Fessenden dan Fessenden 2006) menyatakan bahwa hidrolisis suatu amida dalam larutan asam berlangsung dalam suatu cara yang serupa dengan hidrolisis suatu ester. Oksigen karbonil diprotonasi, karbon karbonil diserang oleh H_2O , proton diserahkan terimakan dan suatu amina dibuang. Amina ini kemudian bereaksi dengan H^+ dan menghasilkan garam amina. Pembentukan garam amina menjelaskan bahwa H^+ bersifat pereaksi, bukan katalis.

Selain itu, hal ini dikarenakan amida memiliki toksisitas yang lebih rendah dan dapat menjaga integritas membran sel. Amida telah diusulkan sebagai alternatif untuk pembekuan semen, terutama untuk semen pejantan yang lebih sensitif terhadap efek racun dari gliserol, karena amida memiliki bobot molekul ($73,09$) dan viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan gliserol (dengan bobot molekul $92,05$), dan untuk permeabilitas membran yang lebih tinggi sehingga dapat mengurangi kemungkinan kerusakan sel yang disebabkan oleh tekanan osmotik. Selain itu penambahan metil (CH_3) kedalam molekul amida dapat meningkatkan permeabilitas membran sperma dan meningkatkan efisiensi kriopreservasi (Bezerra et al.

2011). Dasar pemilihan jenis krioprotektan menurut Squires et al. (2004) selain mengandung bahan yang bekerja melindungi sel pada saat pembekuan juga harus memiliki bobot molekul yang kecil agar lebih mudah dan cepat melakukan penetrasi ke dalam sel sehingga mengurangi toksisitas akibat osmolaritas yang tinggi.

Rafinosa ($C_{18}H_{32}O_{16}$) merupakan gula pereduksi golongan trisakarida (α -D-galaktopiranosil-(1 \rightarrow 6)- α -D-glukopiranosida- β -D-fruktofuranosil) dari satu molekul galaktosa dan glukosa yang terikat melalui ikatan α -1,6, serta satu molekul fruktosa (Bender dan Mayes 2009). Rafinosa yang terdiri dari tiga sakarida yang mempunyai peranan penting pada penyesuaian pengaruh tekanan osmotik. Aktifitas dan sumber energi sakarida dengan berat molekul yang tinggi sangat baik untuk gerakan spermatozoa. Sebagai sumber aktifitas rafinosa yang terdiri dari D-galaktosa, D-glukosa dan D-Fruktosa juga berfungsi menstabilkan kualitas spermatozoa terhadap pengaruh buruk penyimpanan dan pembekuan dalam N_2 cair (Suwarso 1999), sehingga jika dikombinasikan dengan DMF menunjukkan kemampuan yang optimal dalam menjaga integritas membran dan permeabilitas membran yang lebih tinggi dan dapat mengurangi kerusakan sel yang disebabkan oleh tekanan osmotik, serta dapat meningkatkan efisiensi kriopreservasi.

Secara umum rata-rata persentase motilitas spermatozoa yang dipengaruhi oleh krioprotektan gliserol maupun DMF pada pengencer tris-kuning telur trehalosa lebih unggul ($63,37\%$) dengan rata-rata *recovery rate* ($81,47\%$) yang lebih tinggi dibandingkan dengan rata-rata tris-soya rafinosa ($40,65\%$) dengan rata-rata *recovery rate* ($52,26\%$) ($P < 0,05$) (Tabel 3). Hal ini karena di dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa mempunyai komponen yang lebih baik dibandingkan tris-soya rafinosa yaitu kandungan lesitin dan lipoprotein dari kuning telur yang dapat memberikan perlindungan bagi sel sperma yang lebih baik jika dibandingkan dengan lesitin pada kacang kedelai selama proses pembekuan-*thawing*. Kandungan lipid dalam pengencer tris-kuning telur trehalosa lebih dapat melindungi *phospholipid bilayer* pada membran sel. Zhang et al. (2009) menyimpulkan bahwa mekanisme yang tepat dimana lesitin kedelai melindungi spermatozoa selama proses pembekuan-*thawing* masih belum diketahui dengan jelas, dan menyimpulkan bahwa mekanisme lesitin kedelai mirip dengan LDL (*low density lipoprotein*). Dijelaskan lebih lanjut bahwa fosfolipid dari kuning telur dan lesitin kacang kedelai tidak bisa masuk kedalam membran sperma untuk mengubah fosfolipid pada membran, akan tetapi mungkin menggabungkan dengan membran sperma untuk membentuk lapisan pelindung terhadap pembentukan kristal es ekstraseluler yang mematikan dan melindungi membran sperma dari kerusakan mekanis selama proses pembekuan-*thawing*.

Lesitin dari kacang kedelai memiliki kandungan yang mirip dengan lesitin pada kuning telur yang digunakan untuk perlindungan bagi spermatozoa dari efek *cold shock* pada saat kriopreservasi (Thun et al. 2002; Aires et al. 2003). Menurut Aboagla & Terada (2004), kuning telur mengandung lesitin yang mampu melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin. Anti *cold shock* perlu ditambahkan dalam bahan pengencer agar dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (28°C) pada saat pengolahan ke suhu ekuilibriasi (5°C). Anti *cold shock* yang umum ditambahkan adalah kuning telur atau ekstrak kacang kedelai yang dapat melindungi membran spermatozoa pada saat pendinginan dan pembekuan. Khasiat utama kuning telur atau ekstrak kacang kedelai adalah kandungan lesitin (*phosphatidyl choline*) yang dapat bersifat membran coating untuk tetap mempertahankan konfigurasi normal *phospholipid bilayer* yang merupakan susunan utama membran sel spermatozoa. *Cold shock* tersebut akan merubah membran spermatozoa dari konfigurasi normal ke konfigurasi hexagonal yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa (Morel 1999). Ketika membran sperma mengalami kerusakan, enzim aspartat aminotransferase (AspAT) yang merupakan enzim utama dalam mitokondria yang memproduksi ATP akan dilepaskan dari sel dan masuk ke seminal plasma. Kehilangan AspAT akan mengganggu produksi ATP dan mengganggu motilitas spermatozoa (Ariefantini & Purwantara 2010).

Pemeriksaan motilitas spermatozoa diperluas dengan pemeriksaan membran plasma utuh dan spermatozoa hidup. Terdapat hubungan antara pemeriksaan motilitas dan keutuhan membran plasma serta daya hidup spermatozoa. Membran plasma yang rusak akan berpengaruh terhadap motilitas sehingga fertilitas akan terganggu. Hal ini dapat dilihat dari rataan persentase membran plasma utuh setelah *thawing* cenderung lebih tinggi 3% dibandingkan dengan rataan persentase motilitas spermatozoa yaitu sebesar 66,89% pada tris-kuning telur trehalosa dan 41,38% pada tris soya rafinosa. Sementara itu, pemeriksaan spermatozoa hidup selalu didapat lebih tinggi sekitar 4-6% dari persentase spermatozoa motil yaitu 67,28% pada tris-kuning telur trehalosa dan 47,13% pada tris soya rafinosa.

Membran plasma spermatozoa sangat dipengaruhi oleh tekanan osmotik pada bahan pengencer. Tekanan osmotik ini sangat penting dalam mempertahankan keutuhan membran plasma. Sel spermatozoa kambing pada saat pembekuan memiliki toleransi osmolaritas pengencer semen beku antara 325-625 mosmol/kg H₂O (Purdy 2006). Semen segar dari ketiga kambing PE jantan yang digunakan pada penelitian berturut-turut adalah 244; 233; 236 mosmol/kg H₂O dengan rataan tekanan osmotik sebesar 237,67 mosmol/kg H₂O. Hasil

pengukuran tekanan osmotik pada pengencer tris-kuning telur trehalosa DMF, tris-kuning telur trehalosa gliserol, tris-soya rafinosa DMF, dan tris-soya rafinosa gliserol berturut-turut adalah 860; 700; 1210; 1220 mosmol/kg H₂O. Berdasarkan hasil tersebut pengencer yang menunjukkan tekanan osmotik yang mendekati kisaran tersebut adalah tris-kuning telur trehalosa. Hal tersebut membuktikan bahwa tekanan osmotik suatu pengencer memegang peranan penting dalam mempengaruhi membran plasma spermatozoa yang berkorelasi positif terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Apabila membran plasma spermatozoa sudah mengalami kerusakan, maka metabolisme spermatozoa akan terganggu sehingga spermatozoa akan terganggu motilitasnya dan dapat menyebabkan kematian. Hal ini menunjukkan kualitas membran plasma dapat tetap dipertahankan meskipun motilitas menurun.

Pegg (2002) menyatakan stres osmotik pada saat *thawing* disebabkan oleh efek dari krioprotektan yang berlebihan, sehingga menyebabkan sel membengkak dan pecah. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh tekanan osmotik larutan pengencer yang terlalu tinggi sehingga air dari dalam sel akan tertarik keluar yang menyebabkan dehidrasi (Best 2011). Best (2011) menyatakan bahwa air dalam sel terdiri atas *bulk water* yang mengisi 90% dari sel serta *bound water* yang mengisi hanya 10% dari sel. *Bulk water* adalah air yang bisa membeku dan akan keluar akibat perubahan tekanan osmotik. Sedangkan *boundwater* adalah molekul air yang 20-100 kali lebih kental dibandingkan dengan *bulk water*, yang ikatan hidrogennya terikat sangat erat pada permukaan yang bersifat hidrofilik dari makromolekul (protein, asam nukleat atau ujung polar dari kelompok *phospholipids*). Saat terjadi proses pembekuan, bagian luar sel akan mengalami pembekuan terlebih dahulu yang akan menarik air dari dalam sel keluar.

Kriopreservasi menyebabkan kerusakan permanen pada organel sperma, dan perubahan fluiditas membran dan aktifitas enzimatik, terkait dengan penurunan motilitas, viabilitas dan fertilitas spermatozoa (Sariözkan et al. 2009). Kerusakan spermatozoa selama proses kriopreservasi terkait dengan tiga komponen utama, yakni stres osmotik, pembentukan kristal es, dan komposisi lipid membran secara langsung berhubungan dengan perubahan fluiditas membran sperma (fase transisi) dan kemampuan untuk pertukaran panas, ion dan air melalui membran plasma (Watson 2000).

Perbedaan suhu dan osmolaritas antara media pembekuan dan sperma menyediakan variasi yang besar pada volume air dalam sel yang mengarah ke mekanisme stres pada membran sel. Fase transisi yang terjadi selama proses pembekuan mengubah struktur membran dan dapat menghilangkan protein penting sehingga mengurangi efisiensi kriopreservasi.

Reorganisasi membran lipid sperma dapat mengganggu interaksi antara lipid-lipid atau lipid-protein yang diperlukan untuk fungsi membran secara sempurna (Watson 2000). Selain itu, media pembekuan dapat menyebabkan pecahnya membran karena dapat menyebabkan stres osmotik, perubahan membran, dan perubahan dalam mikrotubulus ekor sperma.

Purdy (2006) menyatakan bahwa walaupun gliserol agak beracun bagi spermatozoa dan dapat menyebabkan kerusakan osmotik, gliserol adalah krioprotektan yang paling banyak digunakan untuk pembekuan semen. Penggunaan DMF tidak lebih unggul daripada gliserol jika digunakan sebagai krioprotektan untuk semen kambing (Bezerra et al. 2011). Alvarenga et al. (2005) menyatakan bahwa DMF lebih unggul dalam mempertahankan semen beku kuda. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa DMF yang dikombinasikan dengan pengencer dasar tris untuk pembekuan semen kambing memiliki hasil yang mirip dengan gliserol. Dengan demikian DMF dapat digunakan sebagai krioprotektan alternatif untuk pembekuan semen kambing.

KESIMPULAN

Gliserol sebagai krioprotektan untuk pengencer tris-kuning telur trehalosa yang digunakan dalam mengoptimalkan pembekuan semen menunjukkan peranan yang lebih baik dalam melindungi kualitas spermatozoa pada saat pembekuan dibandingkan dengan DMF sebagai krioprotektan untuk pengencer tris-kuning telur trehalosa, gliserol untuk pengencer tris-soya rafinosa dan DMF untuk pengencer tris-soya rafinosa.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboalga EME, Terada T. 2004. Effect of egg yolk during the freezing step preservative on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62:1160-1172.
- Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. 2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*. 60:269-279.
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*. 53:1053-1061.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57:1801-1808.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*. 89:105-113.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61:895-907.
- Arifiantini RI. 2006. Preservasi semen dengan modifikasi pengencer dan krioprotektan untuk inseminasi buatan pada kuda (disertasi S3). [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.
- Arifiantini RI, Wresdiyati T, Retnani EF. 2006. Morfologi spermatozoa sapi Bali (*Bos sondaicus*) menggunakan pewarnaan "Williams". *J Pengembangan Peternakan Tropis*. 31:105-110.
- Arifiantini RI, Purwantara B. 2010. Motility and viability of Friesian Holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *J Indonesian Trop Anim Agric*. 35:222-226.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Semen evaluation. *In: Hafez B, Hafez ESE. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins. p. 365-389.*
- Barth AD, Oko RJ. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa (US): Iowa State University Press. p. 8-18.
- Bender DA, Mayes PA. 2009. Karbohidrat yang penting secara fisiologis. Dalam: Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. 2009. *Biokimia Harper*. Ed ke-27. Penerjemah: Pendit BU. Jakarta (Indones): EGC. Terjemahan dari: Harper's Illustrated Biochemistry. 27th ed. hlm. 119-127.
- Best B. 2011. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryogenics. [diunduh 2011 Mei 30]. <http://www.benbest.com/pdf>.
- Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra ACS, Silva AR. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology*. 63:263-266.
- Bixara MI. 2009. Memisahkan dan menyimpan gas asetilen menggunakan cecair ionik. Proses "super hijau". [diakses 12 Januari 2012]. <http://howgreenareyou.wordpress.com>.
- Crowe JH, Crowe LM. 2000. Preservation of mammalian cells learning nature's tricks. *Nature Biotechnology*. 18:145-147.
- Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci*. 121:115-123.
- Fessenden RJ, Fessenden JS. 2006. Kimia organik. Ed ke-3. Jilid 2. Penerjemah: Pudjaatmaka AH. Jakarta (Indones): Erlangga, Jakarta. Terjemahan dari: Organic Chemistry. 3rd ed. hlm. 101-240.

- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins. p. 96-109.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in farm animals*. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins. p. 96-442.
- Hafez ESE. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryo. In: Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins. p. 431-442.
- Hermansson U, Linde-Forsberg C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 65:584-593.
- Higashiyama T. 2002. Novel function and applications of trehalose. *Pure Appl Chem*. 74:1263-1269.
- Kimball JW. 1998. *Biologi Jilid 1*. Ed ke-5. Penerjemah: Tjitrosomo SS, Sugiri N. Jakarta (Indones): Erlangga. Terjemahan dari: *Biology*. hlm. 86-115.
- Kostaman T, Utama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing Boer pada pengencer tris sitrat-fruktosa. *J Sain Vet*. 24:58-64.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*. 62:113-141.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: Mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 247:125-142.
- Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*. 58:273-276.
- Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 36:113-122.
- Morel DMCG. 1999. *Equine artificial insemination*. Wallingford (UK): CABI Publishing.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
- Paulenz H, Soederquist L, Adnøy T, Soltun K, Sæther PA, Fjellsøy KR, Berg KA. 2005. Effect of cervical and vaginal insemination with liquid semen stored at room temperature on fertility of goats. *Anim Reprod Sci*. 86:109-117.
- Pegg DE. 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*. 20:5-13.
- Pine SH, Hendrickson JB, Cram DJ, Hammond GS. 1988. *Kimia organik*. Ed ke-4. Penerjemah: Joedodibroto R, Purbo-Hadiwidjono SW. Bandung (Indones): ITB. Terjemahan dari: *Organic Chemistry*. 4th ed. hlm. 265-399.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum Res*. 63:215-225.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. The hypoosmotic swelling test. *Anim Reprod Sci*. 2:139-144.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang B. 2003. Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *JITV*. 7:194-199.
- Sariözkan S, Tuncer PB, Bucak MN, Ulutaş PA. 2009. Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull semen. *ACTA Vet*. 78:463-469.
- Souhoka DF, Matatula MJ, Mesang-Nalley WM, Rizal M. 2009. Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing Peranakan Etawah yang dipreservasi dengan plasma semen domba Priangan. *J Vet*. 10:135-142.
- Squires EL, Keith SL, Graham JK. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 62:1056-1065.
- Steel RGD, Torrie JH. 1995. *Prinsip dan prosedur statistika: suatu pendekatan biometrik*. Penerjemah: Sumantri B. Jakarta (Indones): Gramedia Pustaka Utama. Terjemahan dari: *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 772 hlm.
- Suwarso. 1999. Peranan rafinosa dalam pengencer tris sitrat kuning telur terhadap kualitas semen beku kambing peranakan etawah (tesis S2). [Bogor (Indones)]: Institut Pertanian Bogor.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Utama IK. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *JITV*. 5:84-99.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Utama IK. 2001. Kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah setelah ekuilibrasi. *Hayati*. 8:70-75.
- Thun R, Hurtado M, Janet F. 2002. Comparison of Biochips-Plus® and tris egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57:1087-1094.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 1999. *Fundamental of biochemistry*. New York (NY): John Wiley and Sons. p. 41-277.
- Wade LG. 2000. *Organic chemistry*. 2nd ed. New Jersey (NJ): Prentice-Hall Inc. p. 926-973.
- Watson PF. 2000. The caused of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 60-61: 481-492.
- Yildiz C, Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 54:579-585.
- Zhang SS, Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Zhang XY. 2009. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *Afr J Biotechnol*. 8:6476-6480.