

Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Domba Garut yang Dikriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris

Viability of Frozen-Thawed Epididymal Sperm of Garut Ram Cryopreserved with Modified Tris Extender

MUHAMMAD RIZAL^{1*}, HERDIS²

¹Jurusan Peternakan, Faperta, Universitas Pattimura, Kampus Poka, Jalan Ir. M. Putuhena, Ambon 97233

²Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung BPPT II Lantai 16, Jalan M.H. Thamrin No. 8, Jakarta 10340

Diterima 27 Mei 2004/Disetujui 13 April 2005

Sperm collected from cauda epididymis is a source of male gametes. The purposes of this study was to evaluate an quality of frozen-thawed sperm of garut ram which was collected from cauda epididymis and cryopreserved with modified Tris extender, i.e: Tris extender (control, KT), Tris extender + 60 mM lactose (LS), and Tris extender + 60 mM lactose + 0.05% glutathione (GL). Quality of collected sperm including concentration, motility, live sperm, abnormality, cytoplasmic droplet, intact acrosomal cap (IAC), and intact plasma membrane (IPM) were evaluated. Results showed that mean of sperm concentration, percentages of motility, live sperm, abnormality, cytoplasmic droplet, IAC, and IPM of fresh epididymal sperm were 13,993.33 million/ml, 70.83, 82.83, 10.83, 8.5, 85.83, and 81.33%, respectively. Sperm quality after equilibration for LS and GL were significantly ($P<0.05$) higher than KT. Mean percentages of post thawing sperm motility, live sperm, IAC, and IPM for GL (45, 54.5, 47.83, and 48.83%) were significantly ($P<0.05$) higher than LS (40, 49.17, 43.83, and 44.5%), and KT (35, 42.5, 39.17, and 41.5%). Mean percentages of post thawing sperm motility, live sperm, IAC, and IPM for LS were significantly ($P<0.05$) higher than those of KT. Hence, frozen-thawed epididymal sperm of garut ram after slaughter and cryopreserved with Tris extender + 60 mM lactose (LS) and Tris extender + 60 mM lactose + 0.05% glutathione (GL) possibly can be used for artificial insemination (AI) or *in vitro* embryo production program.

PENDAHULUAN

Domba garut merupakan salah satu domba tropik yang prolific dan memiliki berat badan yang relatif lebih besar dibandingkan dengan domba lokal Indonesia lainnya. Berat badan domba jantan dewasa rata-rata sekitar 60-80 kg, bahkan dapat mencapai lebih dari 100 kg (Tiesnamurti 2002). Dengan demikian domba garut memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan menjadi suatu peternakan yang modern, produktif, dan efisien.

Domba jantan dapat juga dijadikan sebagai donor semen dengan tujuan memperbaiki penampilan domba lokal lainnya, melalui pendekatan teknologi reproduksi. Spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis ternak atau hewan yang telah dipotong belum dimanfaatkan secara optimal sebagai salah satu alternatif sumber spermatozoa untuk memenuhi kebutuhan dalam penerapan berbagai teknologi reproduksi. Menurut Axner *et al.* (1999), Hafez dan Hafez (2000) spermatozoa yang berasal dari bagian *cauda* epididimis telah memiliki motilitas dan kemampuan membuahi oosit yang sama baiknya dengan spermatozoa hasil ejakulasi.

Upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari *cauda* epididimis dalam bentuk semen cair atau semen beku untuk keperluan aplikasi berbagai teknologi reproduksi, menjadi

metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang bermasalah dalam melakukan aktivitas reproduksi. Ternak atau hewan jantan tersebut tidak dapat melakukan ejakulasi secara alami atau tidak memberikan respons terhadap upaya menampung semen menggunakan alat bantu, atau sebab-sebab lain yang menyebabkan hewan tersebut tidak dapat melakukan aktivitas kawin. Metode ini juga akan sangat membantu dalam upaya menyelamatkan plasma nutfah ternak atau hewan jantan yang mati secara mendadak. Teknologi ini dapat menjadi model konservasi terhadap hewan-hewan langka, buas atau liar yang sedang ditangkarkan tetapi tidak dapat kawin secara normal karena kondisi tempat penangkaran yang tidak sesuai dengan kondisi habitat aslinya.

Dalam proses kriopreservasi (pembekuan) semen, akibat perlakuan suhu yang sangat rendah (-196°C) akan terbentuk kristal-kristal es dan peningkatan konsentrasi elektrolit intraseluler yang menyebabkan kerusakan sel spermatozoa. Untuk mengurangi efek ini, di dalam pengencer harus ditambahkan senyawa krioprotektan. Selain gliserol yang berperan sebagai krioprotektan intraseluler, juga dikenal berbagai macam gula seperti laktosa yang dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Menurut Singh *et al.* (1995) laktosa berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler dan penambahan hingga 180 mM laktosa di dalam pengencer Tris nyata meningkatkan kualitas semen beku kambing dibandingkan dengan tanpa penambahan laktosa.

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-311263,
E-mail: icang65@yahoo.com

Pada saat koleksi dan pengolahan spermatozoa sebelum dikemas di dalam *straw*, terjadi kontak antara spermatozoa dan udara luar yang mengandung oksigen. Hal ini mengakibatkan meningkatnya aktivitas metabolisme oksidatif yang juga berarti meningkatnya konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme. Radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup spermatozoa, karena radikal bebas memiliki sifat yang sangat reaktif untuk memperoleh elektron melalui reaksi peroksidasi lipid. Radikal bebas mengambil elektron dari asam lemak tak jenuh fosfolipid membran plasma sel. Jika tidak dicegah dapat mengakibatkan reaksi rantai peroksidasi lipid yang berlangsung terus menerus (autokatalitik) hingga akhirnya merusak seluruh membran plasma sel spermatozoa (Holt 2000). Untuk meminimalkan kerusakan tersebut, di dalam pengencer semen perlu ditambahkan senyawa antioksidan. Senyawa antioksidan ini akan bereaksi dengan radikal bebas sehingga dapat meminimalkan kerusakan yang terjadi pada membran plasma sel spermatozoa. Hal ini terjadi karena reaksi antara radikal bebas dengan senyawa antioksidan tidak menghasilkan radikal bebas baru, sehingga reaksi autokatalitik dapat dicegah (Suryohudoyo 2000).

Glutation merupakan salah satu senyawa antioksidan berupa komponen sulfhidril non-protein di dalam sel yang dapat membersihkan radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran plasma sel (Suryohudoyo 2000; Tuminah 2000) dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif (Gopalakrishnan & Shaha 1998; Gadea *et al.* 2000; Hemachand & Shaha 2003; Raijmakers *et al.* 2003). Dengan demikian *glutation* memungkinkan digunakan dalam proses produksi semen beku. Menurut Takahashi *et al.* (1997), de Matos dan Furnus (2000) *glutation* dapat mengurangi terjadinya reaksi reduksi-oksidasi (redoks) di dalam sel yang menyebabkan rusaknya DNA akibat meningkatnya konsentrasi hidrogen peroksida.

Penelitian ini bertujuan memperbaiki kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis yang dikriopreservasi menggunakan pengencer Tris melalui penambahan laktosa dan *glutation*. Diharapkan bahwa laktosa dan *glutation* mampu memberikan perlindungan yang lebih sempurna terhadap spermatozoa domba yang sangat rentan mengalami kerusakan selama proses kriopreservasi.

BAHAN DAN METODE

Sumber Epididimis dan Metode Pengolahan Spermatozoa.

Epididimis sebanyak enam buah diperoleh dari rumah pemotongan hewan (RPH) tradisional. Epididimis dibersihkan dan dimasukkan ke dalam gelas berisi larutan NaCl fisiologis yang ditutup rapat dan dibawa ke laboratorium dalam kondisi suhu lingkungan. Spermatozoa dikoleksi sekitar tiga jam setelah domba dipotong dengan cara membuat sayatan-sayatan pada *cauda* epididimis menggunakan gunting steril kemudian dibilas-tekan dengan larutan pengencer Tris tanpa gliserol sebanyak 2 ml. Spermatozoa yang telah diencerkan tersebut dibagi ke dalam tiga buah tabung reaksi dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 20 menit

pada suhu kamar dan supernatan dibuang. Sedimen (endapan di dalam tabung setelah disentrifugasi, yakni spermatozoa) diencerkan masing-masing dengan pengencer Tris (kontrol, KT), pengencer Tris + 60 mM laktosa (LS), dan pengencer Tris + laktosa 60 mM + *glutation* (GL) 0.05%. Komposisi pengencer dasar Tris terdiri atas: 3.32 g Tris (hidroksimetil) aminometana, 1.86 g asam sitrat, dan 1.37 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml, kemudian ditambahkan penisilin dan streptomisin masing-masing sebanyak 1000 µg/ml. Komposisi pengencer yang digunakan terdiri atas: 75% pengencer dasar Tris, 5% gliserol, dan 20% kuning telur ayam ras.

Spermatozoa yang telah diencerkan dikemas di dalam *straw* mini (0.25 ml) dengan konsentrasi 200 juta spermatozoa motil per *straw*, kemudian diekuilibrasikan di dalam lemari es pada suhu 5 °C selama tiga jam. Setelah ekuilibrasikan, setiap sampel semen masing-masing perlakuan dievaluasi kualitas spermatozoanya. Pembekuan spermatozoa dilakukan dengan cara meletakkan *straw* 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130 °C) selama 15 menit, kemudian *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196 °C) dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair. Setelah disimpan selama satu minggu, setiap sampel *straw* masing-masing perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk diamati kualitas spermatozoanya. Semen beku *dithawing* dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37 °C (di dalam penangas air) selama 30 detik.

Pengamatan Kualitas Spermatozoa. Peubah kualitas spermatozoa yang diamati meliputi konsentrasi, persentase motilitas, spermatozoa hidup, abnormalitas, butiran sitoplasma, tudung akrosom utuh (TAU), dan membran plasma utuh (MPU). Konsentrasi spermatozoa dihitung dari spermatozoa hasil koleksi sebelum dan setelah diencerkan dengan 2 ml pengencer Tris, sedangkan peubah yang lain diamati setelah spermatozoa diencerkan dengan pengencer Tris. Konsentrasi dihitung menggunakan kamar hitung Neubauer.

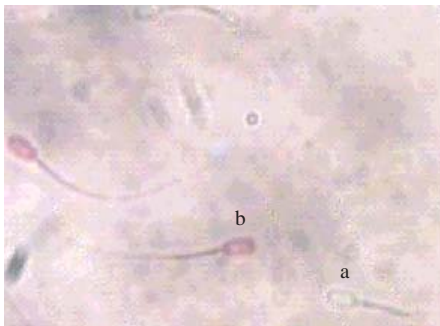
Motilitas spermatozoa ditentukan dengan cara menempatkan satu tetes spermatozoa yang telah diencerkan pada gelas objek yang ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan terhadap spermatozoa yang bergerak progresif dilakukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Angka yang diberikan berkisar antara 0 hingga 100% dengan skala 5% (Toelihere 1993).

Spermatozoa hidup ditentukan dengan metode pewarnaan eosin (Toelihere 1993). Satu tetes spermatozoa ditambahkan satu tetes larutan pewarna eosin kemudian dicampur hingga homogen dan dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek. Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan spermatozoa yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah (Gambar 1). Sebanyak minimum 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Dengan preparat ini, peubah abnormalitas dan butiran sitoplasma diamati.

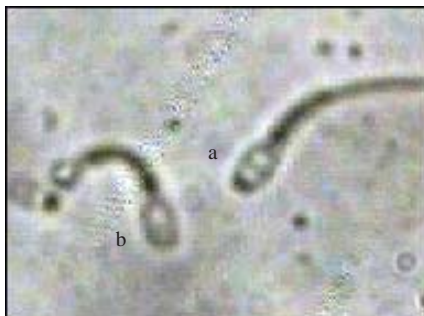
Tudung akrosom utuh (TAU) dievaluasi dengan metode yang dikembangkan oleh Saacke dan White (1972). Sebanyak

25 µl semen ditambahkan ke dalam 100 µl larutan NaCl fisiologis yang mengandung 1% formalin, dikocok pelan hingga homogen dan didiamkan selama 5 menit. Semen dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai oleh ujung kepala yang berwarna hitam tebal, sedangkan yang rusak akan tampak tanpa warna hitam tebal di ujung kepala spermatozoa (Gambar 2).

Membran plasma utuh dievaluasi dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) (Revell & Mrode 1994). Sebanyak 25 µl semen ditambahkan ke dalam 200 µl larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Semen kemudian dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor yang melingkar atau menggelembung, sedangkan spermatozoa yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus (Gambar 3).



Gambar 1. a. Spermatozoa hidup dan b. spermatozoa mati (warna asli adalah merah, lihat bahan dan metode).



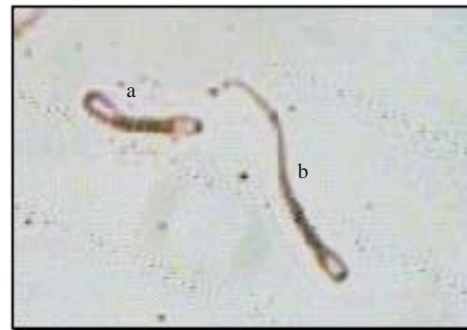
Gambar 2. Spermatozoa dengan tudung akrosom a. utuh dan b. tidak utuh.

Analisis Data. Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan enam kali ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie 1993).

HASIL

Karakteristik Spermatozoa Segar. Pengamatan karakteristik spermatozoa segar dimaksudkan untuk mengetahui kadar pengenceran dan kelayakan spermatozoa untuk diproses menjadi semen beku. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa karakteristik spermatozoa segar asal *cauda* epididimis domba garut memenuhi syarat kualitas untuk diolah menjadi semen beku (Tabel 1).

Kualitas Spermatozoa Setelah Proses Pengolahan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0.05$) terhadap persentase motilitas dan spermatozoa hidup pada tahap setelah ekuilibrasi dan *thawing* (Tabel 2). Pada tahap setelah ekuilibrasi, persentase



Gambar 3. Spermatozoa dengan membran plasma a. utuh dan b. tidak utuh.

Tabel 1. Karakteristik spermatozoa segar asal *cauda* epididimis domba garut

Peubah kualitas spermatozoa	Nilai rata-ran
Konsentrasi (juta/ml)	13 993.33 ± 370.52
Konsentrasi dalam 2 ml pengencer (juta/ml)	2730 ± 478.43
Motilitas (%)	70.83 ± 1.86
Spermatozoa hidup (%)	82.83 ± 1.57
Abnormalitas (%)	10.83 ± 1.34
Butiran sitoplasma (%)	8.50 ± 0.96
TAU (%)	85.83 ± 1.34
MPU (%)	81.33 ± 1.10

TAU: tudung akrosom utuh, MPU: membran plasma utuh, n = 6

Tabel 2. Rata-rata motilitas, spermatozoa hidup, TAU, dan MPU spermatozoa asal *cauda* epididimis domba garut setelah proses pengolahan

Peubah kualitas spermatozoa	Tahap pengolahan spermatozoa	Perlakuan		
		KT	LS	GL
Motilitas (%)	Ekuilibrasi	53.33 ± 2.36a	59.17 ± 1.86b	58.33 ± 2.36b
	<i>Thawing</i>	35.00 ± 2.89a	40.00 ± 2.89b	45.00 ± 4.08c
Spermatozoa hidup (%)	Ekuilibrasi	65.67 ± 3.25a	70.00 ± 2.08b	70.50 ± 2.87b
	<i>Thawing</i>	42.50 ± 2.36a	49.17 ± 1.21b	54.50 ± 2.14c
TAU (%)	Ekuilibrasi	65.53 ± 1.97a	67.67 ± 0.94b	67.17 ± 1.77ab
	<i>Thawing</i>	39.17 ± 3.24a	43.83 ± 2.11b	47.83 ± 2.27c
MPU (%)	Ekuilibrasi	65.50 ± 1.26a	68.17 ± 2.61b	68.33 ± 1.50b
	<i>Thawing</i>	41.50 ± 1.98a	44.50 ± 1.38b	48.83 ± 2.19c

Angka yang diikuti huruf berbeda dalam baris yang sama, menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% (BNT). KT: perlakuan kontrol, LS: perlakuan laktosa, GL: perlakuan laktosa + *glutation*, TAU: tudung akrosom utuh, MPU: membran plasma utuh, n = 6

motilitas dan spermatozoa hidup perlakuan LS (59.17 dan 70%) dan perlakuan GL (58.33 dan 70.5%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan KT (53.33 dan 65.67%). Persentase motilitas dan spermatozoa hidup setelah tahap *thawing* perlakuan GL (45 dan 54.5%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan LS (40 dan 49.17%) dan perlakuan KT (35 dan 42.5%) (Tabel 2).

Nilai persentase TAU pada tahap setelah ekuilibrasi perlakuan LS (67.67%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan KT (65.53%), tetapi tidak nyata ($P > 0.05$) dibandingkan dengan perlakuan GL (67.17%). Pada tahap setelah *thawing*, nilai persentase TAU perlakuan GL (47.83%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan LS (43.83%) dan perlakuan KT (39.17%) (Tabel 2).

Pada tahap setelah ekuilibrasi, nilai persentase MPU perlakuan GL (68.33%) dan perlakuan LS (68.17%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan KT (65.5%). Nilai persentase MPU setelah tahap *thawing* perlakuan GL (48.83%) nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan LS (44.5%) dan perlakuan KT (41.5%) (Tabel 2).

PEMBAHASAN

Pada hasil pengamatan diperoleh konsentrasi spermatozoa asal *cauda* epididimis domba garut rata-rata $13\ 993.33 \pm 370.52$ juta/ml. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi spermatozoa *cauda* epididimis domba garut masih dalam kisaran jumlah seperti yang dilaporkan Senger (1999) bahwa konsentrasi spermatozoa pada *cauda* epididimis hewan mamalia sebesar 10 000-50 000 juta/ml.

Konsentrasi spermatozoa satu buah *cauda* epididimis yang telah diencerkan dengan 2 ml pengencer Tris rata-rata 2730 ± 478.43 juta/ml. Dengan demikian, setelah diencerkan, spermatozoa yang dikoleksi dari satu buah *cauda* epididimis domba garut dapat dikemas ke dalam 19 buah *straw* mini dengan kandungan 200 juta spermatozoa motil. Nilai 19 *straw* diperoleh dengan perhitungan berikut: (volume x persentase motilitas x konsentrasi) dibagi 200 juta, yakni $(2 \times 0.7 \times 2730 \text{ juta})$ dibagi 200 juta = 19.11.

Spermatozoa segar yang dikoleksi dari *cauda* epididimis domba garut yang telah dipotong sekitar tiga jam masih layak digunakan dalam program inseminasi buatan (IB) atau produksi embrio secara *in vitro*, karena memiliki kualitas spermatozoa yang masih baik, yakni persentase motilitas 70.83% dan persentase MPU 81.33% (Tabel 1). Semen yang memenuhi syarat digunakan dalam program IB harus memiliki persentase motilitas paling sedikit sebesar 40% (Toelihere 1993) dan nilai persentase MPU semen segar lebih dari 60% (Revell & Mrode 1994). Nilai seluruh peubah kualitas spermatozoa yang diamati meliputi persentase motilitas, spermatozoa hidup, abnormalitas, butiran sitoplasma, TAU, dan MPU pada spermatozoa *cauda* epididimis kurang lebih sama dengan nilai kualitas semen segar domba garut hasil ejakulasi seperti yang dilaporkan Rizal *et al.* (2003). Persentase motilitas yang diperoleh sama dengan yang dilaporkan Johnson dan Everitt (1995), Senger (1999) bahwa persentase motilitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba setelah diencerkan antara 50 dan 80%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan GL dan LS menghasilkan spermatozoa dengan kualitas terbaik pada tahap setelah dibekukan dan *thawing*, dan memenuhi syarat digunakan untuk keperluan IB atau produksi embrio secara *in vitro*. Hal ini karena spermatozoa pada kedua perlakuan tersebut memiliki persentase motilitas masing-masing sebesar 45% dan 40%, serta persentase TAU 47.83% dan 43.83% (Tabel 2). Semen beku yang layak digunakan dalam program IB harus memiliki persentase motilitas paling sedikit 40% (Toelihere 1993; Hafez & Hafez 2000), dan persentase TAU minimum 30% (Evans & Maxwell 1987). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan laktosa dan *glutathion* di dalam pengencer Tris memberikan efek positif dalam meminimalkan terjadinya kerusakan spermatozoa selama proses pengolahan semen, terutama saat pendinginan, pembekuan, dan *thawing*.

Tingginya nilai kualitas spermatozoa pada pengencer Tris yang ditambahkan laktosa dan *glutathion* (perlakuan LS dan GL) diduga disebabkan oleh laktosa yang dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Dengan demikian laktosa dapat melindungi membran plasma sel spermatozoa dari perusakan secara mekanik selama proses pengolahan semen, terutama saat pendinginan, pembekuan dan *thawing* (Molinia *et al.* 1994a). Laktosa dapat melindungi membran plasma sel spermatozoa karena menurut Subowo (1995) pada bagian luar membran plasma sel hewan terdapat karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid) atau protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks. Di samping itu, laktosa juga dapat dimanfaatkan sebagai substrat sumber energi untuk tetap mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Demikian pula dengan *glutathion* yang berfungsi sebagai senyawa antioksidan yang dapat meminimalkan terjadinya reaksi peroksidasi lipid pada membran plasma sel spermatozoa (Raijmakers *et al.* 2003). Reaksi peroksidasi lipid menyebabkan rusaknya membran plasma sel yang pada akhirnya mengakibatkan kematian spermatozoa. Laktosa dan *glutathion* diduga berperan secara simultan dalam melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama proses kriopreservasi semen, sehingga kerusakan membran plasma sel dapat diminimalkan. Kondisi membran plasma sel yang baik juga akan memberikan pengaruh yang baik pula terhadap motilitas, jumlah spermatozoa hidup, dan tudung akrosom yang utuh. Hal ini karena menurut Subowo (1995) pada membran plasma sel terdapat banyak makromolekul berupa protein, lipoprotein, glikoprotein, dan lain-lain. Makromolekul ini dapat berfungsi sebagai enzim, reseptor, saluran, atau pembawa (*carrier*) yang mengatur lalu lintas keluar masuk sel semua senyawa (substrat) dan elektrolit yang dibutuhkan dalam berlangsungnya seluruh proses biokimia di dalam sel, termasuk metabolisme. Selain itu, membran plasma sel juga melindungi organel-organel yang terdapat di dalam sel dari perusakan secara mekanik. Motilitas (daya gerak) spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme akan berlangsung dengan baik apabila membran plasma sel berada dalam keadaan utuh, sehingga mampu mengatur lalu lintas keluar masuk sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Laktosa berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Supriatna & Pasaribu 1992; Molinia *et al.* 1993; Molinia *et al.*

1994a, 1994b; Singh *et al.* 1995) yang membantu pengeluaran air dari dalam sel. Dengan demikian, pembentukan kristal-kristal es intraseluler dapat dikurangi serta meminimalkan kerusakan membran plasma sel spermatozoa selama proses kriopreservasi semen, terutama pada periode-periode kritis, yakni saat pembekuan dan *thawing*. Menurut Salamon dan Maxwell (2000) laktosa lebih efektif dalam menurunkan suhu kristalisasi selama pembekuan dibandingkan dengan golongan monosakarida, sehingga pembentukan kristal es dapat diminimalkan. Selain itu, menurut Tada *et al.* (1993) laktosa dapat menjaga keseimbangan osmotik ekstra dan intraseluler, mengurangi toksisitas kimia, serta pemasukan air dan gliserol yang berlebihan ke dalam sel. Selanjutnya dinyatakan bahwa laktosa dapat membuat struktur membran plasma sel menjadi lentur, dan mampu mengatur sedemikian rupa proses pengeluaran gliserol dari dalam sel spermatozoa pada saat *thawing*. Dengan demikian, membran plasma sel tidak mengalami tekanan yang terlalu berat pada kedua tahap kritis (pembekuan dan *thawing*) selama proses kriopreservasi semen berlangsung.

Menurut Viswanath dan Shannon (2000) krioprotektan dari golongan karbohidrat seperti laktosa, memiliki kemampuan menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar *hydrated*. Sifat-sifat laktosa ini akan membantu menstabilkan membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas. Aisen *et al.* (2002) menyatakan golongan karbohidrat disakarida seperti laktosa, berperan menggantikan posisi air pada permukaan membran plasma sel spermatozoa yang langsung berhubungan dengan pengencer. Selanjutnya dinyatakan bahwa laktosa dapat berinteraksi langsung dengan gugus pusat fosfolipid polar selama pembekuan, dan menurunkan interaksi ikatan van der Waals di antara rantai karbon.

Perbaikan kualitas semen yang dikriopreservasi dengan pengencer Tris dan ditambahkan berbagai konsentrasi laktosa telah dilaporkan pada kambing (Singh *et al.* 1995). Persentase motilitas dan spermatozoa hidup setelah *thawing* masing-masing 51.08 dan 56.75% untuk penambahan 180 mM laktosa, 47.72 dan 52.81% untuk penambahan 120 mM laktosa, serta 46.36 dan 50.89% untuk penambahan 60 mM. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan persentase motilitas dan spermatozoa hidup semen yang tidak ditambahkan laktosa (kontrol), yakni masing-masing 45.49 dan 48.37%.

Glutation merupakan senyawa antioksidan yang dapat membersihkan radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid pada membran plasma sel (Sikka 1996; Suryohudoyo 2000; Tuminah 2000), sehingga memungkinkan digunakan dalam pengencer untuk proses kriopreservasi semen. *Glutation* berfungsi mencegah terjadinya reaksi rantai peroksidasi lipid membran plasma sel spermatozoa selama proses pembekuan dan *thawing* semen beku, sehingga dapat meningkatkan motilitas dan integritas akrosom setelah *thawing* (Holt 2000; Foote *et al.* 2002).

Penambahan *glutation* di dalam pengencer untuk meminimalkan penurunan kualitas semen berbagai ternak telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Slaweta dan Laskowska (1987) melaporkan terjadi peningkatan persentase motilitas

spermatozoa semen beku sapi dari 30.3 menjadi 33.1% dengan penambahan *glutation* 5 mM di dalam pengencer susu. Demikian pula Sinha *et al.* (1996) yang melaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa semen beku kambing meningkat dengan menambahkan *glutation* di dalam pengencer Tris. Persentase motilitas spermatozoa semen yang diencerkan dengan pengencer Tris + *glutation* 5 mM rata-rata 53.64%, rata-rata 48.9% untuk semen yang diencerkan dengan pengencer Tris + *glutation* 2 mM, dan rata-rata 47.8% untuk semen yang diencerkan dengan pengencer Tris tanpa penambahan *glutation*. Triwulanningsih *et al.* (2003) melaporkan bahwa penambahan 0.5 mM *glutation* di dalam pengencer Tris mampu meningkatkan persentase motilitas, spermatozoa hidup, TAU, dan MPU spermatozoa semen cair sapi. Pada penambahan *glutation* 0.5 mM terjadi peningkatan persentase motilitas dari 46.72 menjadi 52.34%, persentase spermatozoa hidup dari 63.59 menjadi 69.11%, persentase TAU dari 60.81 menjadi 62.75%, dan persentase MPU dari 66.01 menjadi 69.75% setelah semen disimpan pada suhu 5 °C selama delapan hari.

Secara umum kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis domba garut yang telah dibekukan lebih rendah dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi. Sebagai perbandingan, persentase motilitas, spermatozoa hidup, TAU, dan MPU semen beku domba garut hasil ejakulasi adalah masing-masing rata-rata 52.78, 58.78, 54.22, dan 56.22% (Rizal *et al.* 2002), sedangkan pada spermatozoa *cauda* epididimis hanya masing-masing rata-rata 45, 54.5, 47.83, dan 48.83% (Tabel 2). Kualitas spermatozoa yang dikoleksi dari bagian *cauda* epididimis dan yang telah dibekukan lebih rendah dibandingkan dengan spermatozoa hasil ejakulasi, juga dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Garde *et al.* (2000) melaporkan persentase motilitas dan akrosom utuh spermatozoa hasil ejakulasi rusa merah iberial yang telah dibekukan masing-masing rata-rata 51.7 dan 50%. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan persentase motilitas dan akrosom utuh spermatozoa asal *cauda* epididimis yang hanya sebesar rata-rata 45 dan 49%. Hasil serupa juga dilaporkan Squires *et al.* (2000) bahwa persentase motilitas spermatozoa kuda setelah *thawing* rata-rata 5 dan 23% masing-masing untuk spermatozoa asal *cauda* epididimis dan semen hasil ejakulasi.

Rendahnya kualitas spermatozoa asal *cauda* epididimis setelah pengolahan diduga karena tidak seperti pada spermatozoa hasil ejakulasi, membran plasma spermatozoa asal *cauda* epididimis tidak mendapatkan perlindungan berupa glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis hewan jantan yang disekresikan ke dalam plasma semen. Glikoprotein ini sangat penting dalam melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh kejutan dingin pada saat koleksi spermatozoa dan selama proses kriopreservasi semen. Hal ini menyebabkan menurunnya daya hidup spermatozoa *cauda* epididimis serta meningkatnya persentase reaksi akrosom yang prematur akibat rusaknya membran plasma sel. Hal yang sama dilaporkan Squires *et al.* (2000) bahwa kualitas spermatozoa *cauda* epididimis dapat ditingkatkan dengan menambahkan plasma semen sebelum diolah. Menurut Nolan dan Hammerstedt (1997) seiring dengan proses pematangan spermatozoa di dalam epididimis, juga

terjadi perubahan komposisi senyawa penyusun membran plasma sel. Sebagian kolesterol yang terdapat pada membran plasma sel diserap, sehingga nisbah antara asam lemak tak jenuh dan kolesterol meningkat. Hal ini menyebabkan membran plasma sel menjadi kurang stabil, karena permeabilitas meningkat. Untuk mencegah terjadinya reaksi akrosom prematur, membran plasma sel spermatozoa diproteksi oleh senyawa-senyawa inhibitor berupa glikoprotein yang disintesis oleh kelenjar vesikularis (Gilbert 1988; Johnson & Everitt 1995; Nolan & Hammerstedt 1997).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Jakarta dan peternakan domba laga "Lesan Putra" PT Sarbi Moerhani Lestari, Ciomas, Bogor atas dukungan dana, hewan percobaan, dan fasilitas-fasilitas pendukung lainnya sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisen EG, Medina VH, Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57:1801-1808.
- Axner E, Forsberg CL, Einarsson S. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different region of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* 45:767-777.
- de Matos DG, Furnus CC. 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.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. London: Butterworths.
- Footo RH, Brockett CC, Kaproth MT. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71:1 (Abstrak).
- Gadea J *et al.* 2000. Effect of the presence of glutathione in the thawing diluent on the penetrability capacity of porcine oocytes *in vitro*. Di dalam: *Proceedings 14th ICAR*; Stockholm, 2-6 Jul 2000. Abstract Vol 2, 17:11.
- Garde J *et al.* 2000. Evaluation of two glycerol concentrations in freezing of electroejaculated and epididymal spermatozoa from iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Di dalam: *Proceeding 14th International Congress on Animal Reproduction*; Stockholm, 2-6 Jul 2000. Abstract Vol. 2, 17:14.
- Gilbert SF. 1988. *Developmental Biology*. Ed Ke-2. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc Publ.
- Gopalakrishnan B, Shaha C. 1998. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Lett* 422:296-300.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. Anatomy of male reproduction. Di dalam: *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke-7. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. hlm 3-12.
- Hemachand T, Shaha C. 2003. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Lett* 26999:1-5.
- Holt WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62:3-22.
- Johnson MH, Everitt BJ. 1995. *Essential Reproduction*. Ed ke-4. Oxford: Blackwell Sci.
- Molinia FC, Evans G, Guintana-Casares PI, Maxwell WMC. 1993. 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.
- Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. 1994a. Effect of polyols on the post-thawing of pellet-frozen ram spermatozoa. *Theriogenology* 42:15-32.
- Molinia FC, Evans G, Maxwell WMC. 1994b. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42:849-858.
- Nolan JP, Hammerstedt RH. 1997. Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J* 11:670-682.
- Raijmakers MTM *et al.* 2003. Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil Steril* 79:169-172.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36:77-86.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2002. Efektivitas berbagai konsentrasi glutation terhadap kualitas semen yang telah dibekukan pada domba garut. *J Biosains* 7:22-28.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2003. Kriopreservasi semen domba garut dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan* 19:78-83.
- Saacke RG, White JM. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. Di dalam: *Proceeding 4th Tech Conf on AI and Reprod*, NAAB. hlm 22-27.
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62:77-111.
- Senger PL. 1999. The organization and function of the male reproductive system. Di dalam: *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman: Current Conceptions, Inc. hlm 51.
- Sikka SC. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience* 1:78-86.
- Singh MP, Sinha AK, Singh BK. 1995. Effect cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 43:1047-1053.
- Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of goat semen. *Anim Reprod Sci* 41:237-243.
- Slaweta R, Laskowska T. 1987. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull sperm. *Anim Reprod Sci* 13:249-253.
- Squires EL, Gomez-Cuetara C, Graham JK. 2000. Effect of seminal plasma on cryopreserving epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. Di dalam: *Proceeding 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, 2-6 Jul 2000. hlm 38.
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Subowo. 1995. *Biologi Sel*. Bandung: Angkasa.
- Supriatna I, Pasaribu FH. 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Suryohudoyo P. 2000. Oksidan, antioksidan, dan radikal bebas. Di dalam: *Kapita Selektu Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: CV Sagung Seto. hlm 31-47.
- Tada N, Sato M, Amann E, Ogawa S. 1993. A simple and rapid method for cryopreservation of mouse 2-cell embryos by vitrification: beneficial of sucrose and raffinose on their cryosurvival. *Theriogenology* 40:333-344.
- Takahashi M, Saka N, Kanai Y, Okano A. 1997. Depletion of glutathione causes DNA damage and increase of hydrogen peroxide levels in bovine embryos. *Theriogenology* 47:321 (Abstrak).
- Tiesnamurti B. 2002. Kajian genetik terhadap induk domba priangan peridi ditinjau dari aspek kuantitatif dan molekuler [Disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Triwulanningsih E, Situmorang P, Sugiarti T, Sianturi RG, Kusumaningrum DA. 2003. Pengaruh penambahan glutathione pada medium pengencer sperma terhadap kualitas semen cair. *J Ilmu Ternak Veteriner* 8:91-97.
- Tuminah S. 2000. Radikal bebas dan antioksidan, kaitannya dengan nutrisi dan penyakit kronis. *Cermin Dunia Kedokteran* 128:49-51.
- Viswanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim Reprod Sci* 62:23-25.