

PENGARUH GLISEROL DALAM PENGECER TRIS TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU KAMBING PERANAKAN ETAWAH

SURYA NATAL TAMBING¹, MOZES R. TOELIHERE², TUTY L. YUSUF², dan I KETUT SUTAMA³

¹ Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Gowa
Kotak Pos 4 Sungguminasa, Indonesia

² Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor
Jalan Lodaya II Ujung, Bogor, Indonesia

³ Balai Penelitian Ternak
P.O. Box 221, Bogor 16002, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 6 Desember 1999)

ABSTRACT

TAMBING, S.N., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, and I-K. SUTAMA. 2000. Effects of glycerol in tris extender on frozen semen quality of crossbred Etawah bucks. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (2) :

Bucks semen is easily damaged during freezing process, due to the formation of ice crystals. Consequently, semen quality decreases particularly the post-thaw sperm motility, viability, intact plasma membrane and intact acrosomal cap. The objectives of this research are to determine the optimum dose of glycerol in Tris extender in maintaining frozen semen quality of crossbred Etawah bucks. Four head of PE buck of 2 - 4 years old were used in this experiment. Doses of glycerol used were 5%, 6% and 7%. Semen was collected once a week using artificial vagina. Results of this experiment indicated that the mean percentage of pre-freezing motility, live sperm, sperm with intact plasma membrane and intact acrosomal cap in 5%, 6% and 7% glycerol were not significantly different ($P>0.05$). After freezing, the mean percentage of motility, live sperm, sperm with intact plasma membrane and intact acrosomal cap in 6% glycerol (52.60%, 65.03%, 45.63% and 47.54% respectively) were significantly higher ($P<0.05$) than in 5% (44.31%, 52.00%, 37.60% and 37.00% respectively) and in 7% glycerol (45.28%, 52.10%, 37.97% and 37.14% respectively). However, there were not significant differences in 5% and 7% glycerol for any parameter measured. It was concluded that supplementation of glycerol 6% in Tris extender effective to protect of sperm from various shock during the process of semen cryopreservation, so that it could maintain of frozen semen quality (sperm motility, viability, intact plasma membrane and intact acrosomal cap) that suitable used in AI program of crossbred Etawah bucks.

Key words : Glycerol, PE bucks, semen quality

ABSTRAK

TAMBING, S.N., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, dan I-K. SUTAMA. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (2) :

Semen kambing mudah mengalami kerusakan selama proses pembekuan, yang disebabkan oleh adanya pembentukan kristal-kristal es. Akibatnya, terjadi penurunan kualitas semen khususnya motilitas, daya hidup, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa sesudah *thawing*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan dosis optimum gliserol dalam pengencer Tris dalam mempertahankan kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah (PE). Dalam penelitian ini digunakan 4 ekor kambing PE jantan umur 4 tahun. Dosis gliserol yang digunakan adalah 5%, 6% dan 7%. Semen ditampung sekali dalam seminggu dengan menggunakan vagina buatan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas, spermatozoa hidup, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa sebelum pembekuan pada gliserol 5%, 6% dan 7% tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Sesudah pembekuan, rata-rata persentase motilitas, spermatozoa hidup, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa pada pengencer dengan gliserol 6% (masing-masing : 52,60%; 65,03%; 45,63%; dan 47,54%) nyata lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan pada pengencer dengan gliserol 5% (masing-masing : 44,31%; 52,00%; 37,60%; dan 37,00%) dan 7% (masing-masing : 45,28%; 52,10%; 37,97%; and 37,14%). Bagaimanapun, tidak ada perbedaan yang nyata pada pengencer dengan gliserol 5% dan 7% untuk setiap parameter yang diamati. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan gliserol 6% dalam pengencer Tris berhasil melindungi spermatozoa dari berbagai cekaman selama proses kriopreservasi semen, sehingga dapat mempertahankan kualitas semen beku (motilitas, daya hidup, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa) yang layak dipakai dalam program IB pada kambing Peranakan Etawah.

Kata kunci : Gliserol, kambing PE, kualitas semen

PENDAHULUAN

Salah satu upaya yang ditempuh untuk memperbaiki mutu genetik kambing lokal di Indonesia adalah melakukan persilangan dengan kambing bergenetik unggul melalui teknologi inseminasi buatan (IB), seperti kambing Peranakan Etawah (PE). Pelaksanaan IB pada kambing sampai saat ini masih terbatas dan masih dalam taraf uji coba, sedangkan hasilnya belum banyak dilaporkan. Berbagai laporan hasil penelitian di luar negeri menunjukkan angka konsepsi yang diperoleh dari hasil IB pada kambing bervariasi antara 33.3% sampai 84% (RITAR dan SALAMON, 1983; BARIL *et al.*, 1993).

Kualitas semen beku merupakan salah satu faktor pembatas terhadap keberhasilan program IB pada kambing. Semen kambing mudah mengalami kerusakan selama proses pembekuan karena terjadinya pembentukan kristal-kristal es yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. TOELIHERE (1985) menyatakan bahwa selama proses pembekuan semen, kristal-kristal es yang terbentuk akan menyebabkan konsentrasi elektrolit meningkat di dalam sel yang akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa, dan pada waktu *thawing* akan mengubah permeabilitas membran plasma sehingga spermatozoa akan mati.

Selain itu, plasma semen kambing (termasuk semen kambing PE) mengandung faktor *egg-yolk coagulating enzyme* yang dapat bersifat toksik dan membunuh spermatozoa. Enzim ini diduga adalah fosfolipase A yang berasal dari kelenjar *bulbo-urethralis* dan bila berkontak dengan medium yang mengandung kuning telur akan merusak lesitin dari kuning telur sehingga akan menimbulkan efek toksik pada sperma kambing (EVANS dan MAXWELL, 1987). Lesitin dari kuning telur akan diuraikan oleh enzim fosfolipase A menjadi lisolesitin dan asam lemak tak jenuh.

Penambahan krioprotektan seperti gliserol merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi rendahnya kualitas semen beku kambing. Hal ini didasarkan pada peranan gliserol dalam melindungi membran plasma, mencegah kerusakan fisik dan fungsional sel spermatozoa selama proses pembekuan semen akibat terbentuknya kristal-kristal es. Efek gliserol adalah mencegah pengumpulan molekul H₂O dan mencegah kristalisasi es pada daerah titik beku larutan (MAZUR, 1980) serta mencegah terjadinya dehidrasi karena memiliki daya ikat yang kuat terhadap air (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992).

Penelitian mengenai penambahan gliserol ke dalam bahan pengencer pada proses pembekuan semen kambing PE masih jarang dilakukan, tetapi pada proses pembekuan semen jenis kambing yang lain sudah ada namun hasilnya bervariasi satu dengan yang lain (SINHA *et al.*, 1992; TULI dan HOLTZ, 1994; SINGH *et al.*, 1996). Oleh karena itu, tujuan penelitian ini adalah

untuk mengetahui peranan penambahan gliserol dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen beku kambing PE.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan kambing PE jantan sebanyak empat ekor berumur 2 – 4 tahun, sehat dan organ reproduksinya normal. Keempat pejantan tersebut ditempatkan di dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa rumput-rumputan dan leguminosa serta diberi tambahan konsentrat 750 gram/ekor/hari. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

Semen ditampung satu kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan. Segera setelah penampungan, semen dievaluasi meliputi evaluasi secara makroskopik (volume, warna, kekentalan dan pH) dan secara mikroskopik (gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas, persentase hidup, persentase abnormalitas, persentase tudung akrosom utuh, dan persentase membran plasma utuh). Semen segar yang akan diencerkan harus memenuhi syarat, yaitu minimal persentase motilitas 70%, konsentrasi 2×10^9 sel/ml, gerakan massa ++/+++ , persentase hidup minimal 80% dan persentase abnormal tidak lebih dari 15%.

Semen yang telah memenuhi syarat langsung dibagi dalam tiga bagian, dan dicampur dengan bahan pengencer Tris (Tabel 1) tanpa gliserol. Selanjutnya ditambahkan gliserol secara perlahan-lahan (sistem satu tahap) pada suhu kamar sampai mencapai dosis pengujian, yaitu 5%, 6% dan 7%.

Tabel 1. Komposisi pengencer yang digunakan dalam penelitian

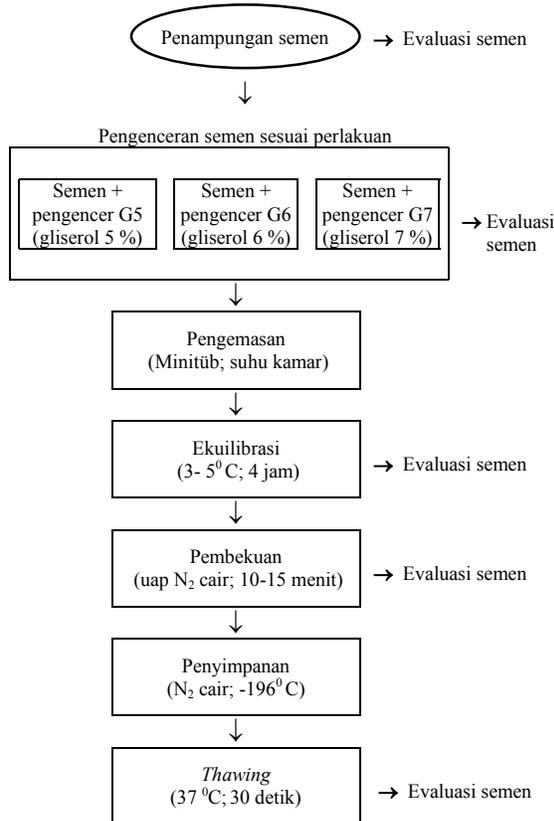
Bahan	Komposisi*		
	G5	G6	G7
Tris (gr)	2,96	2,96	2,96
Asam sitrat (gr)	1,65	1,65	1,65
Fruktosa (gr)	2,0	2,0	2,0
Kuning telur (ml)	20	20	20
Gliserol (ml)	5	6	7
Penisilin (IU/ml)	1.000	1.000	1.000
Streptomisin (µg/ml)	1.000	1.000	1.000
Aquabides (ml) <i>ad</i>	100	100	100

Keterangan : * G5 = gliserol 5%; G6 = gliserol 6%, G7 = gliserol 7%

Semen yang telah diencerkan selanjutnya dikemas di dalam ministraw sistem Minitüb dan diekuilibrasikan pada suhu 3 - 5°C selama empat jam di dalam lemari pendingin. Selanjutnya dilakukan proses pembekuan yang diawali dengan menempatkan Minitüb pada rak 2-

3 cm di atas permukaan N₂ cair selama 10-15 menit. Kemudian Minitüb disimpan di dalam kontainer yang berisi N₂ cair (suhu -196°C). Thawing semen beku dilakukan dengan menggunakan air pada suhu 37°C selama kurang lebih 30 detik.

Evaluasi semen dilakukan sebelum diencerkan, sesudah pengenceran, sesudah ekuilibrasi dan sesudah pencairan kembali (Gambar 1).



Gambar 1. Prosedur kerja untuk penelitian pengaruh gliserol dalam proses pembekuan semen kambing PE

Jumlah pengencer yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus menurut TOELIHERE (1985):

$$\text{Jumlah pengencer (ml)} = \frac{\text{Volume semen} \times \text{motilitas} \times \text{konsentrasi}}{\text{Dosis IB (100 x 10}^6\text{)/0.25}} - \text{volume}$$

Parameter yang diamati pada penelitian ini meliputi (1) kuantitas dan kualitas semen segar, yaitu volume, warna, kekentalan, pH, gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas, persentase hidup, persentase abnormalitas, persentase tudung akrosom utuh, dan persentase membran plasma utuh, dan (2) kualitas semen beku, yaitu persentase motilitas, persentase

hidup, persentase tudung akrosom utuh, dan persentase membran plasma utuh setelah pengenceran, ekuilibrasi dan thawing.

Motilitas spermatozoa yang bergerak ke depan (progresif) diukur menggunakan haemositometer, dengan kamar hitung *Neubauer*. Semen diencerkan dengan menggunakan NaCl fisiologik. Penghitungan jumlah sperma motil progresif diamati di bawah mikroskop cahaya pembesaran 40 kali, yaitu (I) dengan menghitung jumlah sperma yang diam (termasuk bergerak di tempat), kemudian dilanjutkan proses fiksasi, dan (II) menghitung kembali total sperma yang mati pada kotak yang sama. Persentase motilitas sperma dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\frac{\text{jumlah sperma mati setelah fiksasi} - \text{jumlah sperma mati sebelum fiksasi}}{\text{jumlah sperma mati setelah fiksasi}} \times 100\%$$

Spermatozoa hidup yang ditandai oleh kepala yang transparan atau tidak berwarna bila diwarnai dengan zat pewarna eosin-negrosin, dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 40 kali.

Abnormalitas spermatozoa ditandai oleh adanya kelainan pada kepala dan ekor (kepala membesar atau mengecil, ekor pendek atau hilang), dihitung dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran minimal 40 kali dan jumlah spermatozoa yang diamati sebanyak 200 ekor.

Membran plasma utuh (MPU) dihitung atau diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran objektif 40 kali dan jumlah spermatozoa yang diamati sebanyak 200 ekor. Ciri dari membran plasma spermatozoa yang utuh adalah ekor spermatozoa melingkar atau membengkak, sedangkan yang rusak ditandai dengan ekor spermatozoa lurus bila dipaparkan dalam larutan hiposmotik (HOS).

Tudung akrosom utuh (TAU) juga diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran objektif 40 kali dan jumlah spermatozoa yang diamati sebanyak 200 ekor. Tudung akrosom yang utuh ditandai oleh tudung atau penutup bagian ujung kepala spermatozoa berwarna hitam, sedangkan yang rusak tudung akrosomnya berwarna putih (mengkilat) bila dipaparkan dengan larutan formalin 1%. dan pemeriksaan dilakukan.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menurut STEEL dan TORRIE (1993), dimana dosis gliserol sebagai perlakuan dan jumlah penampungan (ejakulat) sebagai ulangan. Sedangkan untuk mengetahui perbedaan hasil antar perlakuan digunakan uji Duncan menurut STEEL dan TORRIE (1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

Pemeriksaan karakteristik semen segar kambing PE dilakukan dengan maksud untuk mengetahui apakah semen tersebut layak untuk dibekukan dan untuk menentukan tingkat pengenceran yang akan digunakan. Hasil pemeriksaan memperlihatkan bahwa rata-rata nilai sifat-sifat semen segar kambing PE yang diperoleh selama penelitian cukup baik dan memenuhi persyaratan untuk dibekukan (Tabel 2). Syarat semen segar yang akan dibekukan yaitu minimal persentase motilitas 70%, konsentrasi 2×10^9 sel/ml, gerakan massa ++/+++ , persentase hidup minimal 80% dan persentase abnormal tidak lebih dari 15%.

Tabel 2. Rataan nilai karakteristik semen segar kambing PE

Karakteristik semen	Nilai rata-rata
Volume (ml)	1,08 ± 47
Warna	putih-krem
Konsistensi	Kental
Konsentrasi spermatozoa (juta sel/ml)	2.801,43 ± 438,79
pH	7,07 ± 0,21
Gerakan massa	+++
Motilitas (%)	74,29 ± 2,70
Hidup (%)	83,43 ± 4,92
Abnormalitas (%)	9,57 ± 0,87
Tudung akrosom utuh (%)	78,07 ± 4,82
Membran plasma utuh (%)	81,45 ± 4,45

Persentase motilitas spermatozoa

Penambahan gliserol ke dalam pengencer Tris tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa sebelum pembekuan (sesudah pengenceran dan ekuilibrasi) (Tabel 3). Namun pasca pembekuan pengaruh gliserol sudah terlihat, dimana penambahan gliserol sebesar 6% sesudah *thawing* menghasilkan persentase motilitas (52,60%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (44,31%) dan 7% (45,28%). Sedangkan penambahan gliserol 5% dan 7% tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal ini didukung juga oleh tingkat penurunan persentase motilitas dari pengenceran sampai *thawing*, dimana penambahan gliserol 6% menghasilkan penurunan motilitas spermatozoa (17,51%) nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (24,79%) dan 7% (24,81%). Sedangkan penambahan gliserol 5% dan 7% tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

Dengan demikian penambahan gliserol 6% ke dalam pengencer Tris mampu memberikan perlindungan terhadap semen kambing PE dari pengaruh yang merugikan. Pengaruh perlindungannya yaitu memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk selama proses pembekuan, sehingga kerusakan organel-organel

sel spermatozoa dapat dihindarkan. Bila organel-organel sel spermatozoa rusak, seperti mitokondria maka rantai oksidasi akan terputus sehingga proses metabolisme tidak berlangsung dan akhirnya sel spermatozoa mati. TOELIHERE (1985) menyatakan bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer adalah esensial untuk pembekuan semen. Gliserol dapat berdifusi ke dalam sel spermatozoa dan dapat dimetabolisir dalam proses-proses yang menghasilkan energi dan membentuk fruktosa. Gliserol akan memasuki siklus perombakan fruktosa pada triosa fosfat dan selanjutnya akan dirombak menjadi asam laktat untuk dioksidasi lebih lanjut. Fruktosa yang tersedia ini akan menyebabkan spermatozoa tetap bergerak, karena fruktosa berperan menghasilkan energi berupa ATP yang mengandung fosfat anorganik (P_i) kaya energi dan akan digunakan untuk kontraksi fibril-fibril serta menghasilkan gerak spermatozoa.

Peranan lain dari gliserol adalah dapat mencegah terjadinya dehidrasi, karena memiliki daya pengikat air yang kuat. Sifat demikian mempengaruhi tekanan uap sehingga titik beku medium akan menurun, akibatnya sel spermatozoa akan memperoleh kesempatan lebih lama untuk mengeluarkan air dan pengeluaran air baru akan terjadi pada temperatur yang lebih rendah lagi. MAZUR (1980) mengatakan gliserol mencegah pengumpulan molekul-molekul H_2O dan mencegah kristalisasi es pada daerah titik beku larutan.

Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa bila konsentrasinya di dalam pengencer optimal, dan bila tidak optimal akan menimbulkan gangguan pada spermatozoa berupa penurunan kualitas spermatozoa. Dari hasil penelitian terlihat bahwa penambahan gliserol sebesar 5% dan 7% ke dalam pengencer Tris menghasilkan persentase motilitas spermatozoa rendah sesudah *thawing*. Hal ini berarti bahwa dosis gliserol sebanyak 5% dan 7% belum mampu mencegah terbentuknya kristal-kristal es dalam sel spermatozoa selama proses pembekuan. Kristal-kristal es yang besar dan tajam akan merusak organel-organel sel spermatozoa secara mekanik (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992). Efek toksisitas dari gliserol adalah memodifikasi struktur membran plasma dan pada konsentrasi yang tinggi menghambat metabolisme energi (MCLAUGHLIN *et al.*, 1992) serta mengubah osmolaritas pengencer (FARSTAD, 1996).

Hasil penelitian yang diperoleh ini sejalan dengan hasil penelitian SINHA *et al.* (1992) yang mendapatkan bahwa penambahan gliserol sebesar 6% dalam pengencer Tris memberikan persentase motilitas spermatozoa kambing yang lebih tinggi (58,10%) sesudah *thawing* dibandingkan penambahan gliserol 5% (57,39%) dan 7% (57,93%). Standar gliserol dalam pengencer semen kambing yang dianjurkan adalah 6-8% (EVANS dan MAXWELL, 1987).

Tabel 3. Rataan persentase motilitas spermatozoa dan penurunannya dari pengenceran sampai *thawing* pada berbagai dosis gliserol

Tahapan pengamatan	Dosis gliserol (%)		
	5	6	7
Sesudah pengenceran	69,10 ± 2,11 ^a	70,11 ± 1,87 ^a	70,09 ± 3,50 ^a
Sesudah ekuilibrasi	60,13 ± 5,65 ^a	62,29 ± 6,83 ^a	60,40 ± 4,56 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	44,31 ± 2,43 ^b	52,60 ± 5,59 ^a	45,28 ± 2,00 ^b
Penurunan dari pengenceran Sampai <i>thawing</i>	24,79 ± 2,01 ^b	17,51 ± 6,34 ^a	24,81 ± 5,10 ^b

Keterangan : Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Persentase hidup spermatozoa

Penambahan gliserol ke dalam pengencer Tris belum mempengaruhi daya hidup spermatozoa sebelum pembekuan. Hal ini terlihat dari hasil analisis statistik yang menunjukkan bahwa penambahan gliserol tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase hidup spermatozoa setelah pengenceran dan ekuilibrasi (Tabel 4). Namun pada pasca pembekuan penambahan gliserol sudah memperlihatkan pengaruhnya, dimana penambahan gliserol sebesar 6% menghasilkan persentase hidup spermatozoa (65,03%) setelah *thawing* lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (52%) dan 7% (52,10%). Sedangkan penambahan gliserol 5% dan 7% tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal ini didukung lagi bila dilihat dari tingkat penurunan persentase hidup spermatozoa dari pengenceran sampai *thawing* dimana penambahan gliserol 6% (15,63%) nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (27,36%) dan 7% (27,40%), sedangkan penambahan gliserol 5% dan 7% tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hal ini berarti bahwa penambahan gliserol sebesar 6% ke dalam pengencer Tris mampu melindungi spermatozoa akibat pengaruh cekaman dingin selama proses pembekuan semen. Efek perlindungannya adalah menjaga keseimbangan elektrolit intra dan ekstraseluler sehingga proses biokimia yang terjadi di dalam sel spermatozoa tetap berlangsung dan mengurangi kematian sel spermatozoa yang berlebihan. Sedangkan efek dari cekaman dingin adalah tingginya kematian spermatozoa sesudah *thawing*, sebagai akibat tingginya daya kontraksi selubung lipoprotein dinding sel dibandingkan isi sel.

Gliserol akan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan akan dipakai oleh spermatozoa untuk metabolisme oksidatif, menggantikan air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit, menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler serta mengurangi daya rusaknya terhadap sel spermatozoa (TOELIHERE, 1985). 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 spermatozoa. Dengan adanya gliserol dalam medium pengencer diharapkan peningkatan konsentrasi elektrolit di atas level yang merugikan dapat dihindarkan (KUMAR *et al.*, 1992).

Dari hasil penelitian terlihat pula bahwa daya perlindungan terhadap spermatozoa pada penambahan gliserol sebesar 5% dan 7% sangat rendah, yang ditandai dengan rendahnya persentase hidup spermatozoa yang diperoleh setelah *thawing*. Hal ini mungkin disebabkan pada penambahan gliserol 5% dan 7% ke dalam pengencer Tris belum mampu mengurangi terjadinya dehidrasi karena konsentrasi molekul di dalam sel yang tinggi, mengakibatkan air akan masuk cepat ke dalam sel sedangkan pengeluaran gliserol dari dalam sel lambat (MCLAUGHLIN *et al.*, 1992). Dengan demikian konsentrasi air intra dan ekstraseluler menjadi tidak seimbang mengakibatkan membran plasma sel spermatozoa akan mengembang dan pecah.

Khusus pada semen kambing, adanya enzim fosfolipase A pada plasma semen yang disekresikan oleh kelenjar bulbo-urethralis akan mudah merusak medium pengencer semen terutama yang mengandung kuning telur, sehingga menyebabkan spermatozoa banyak yang mati. Tingginya konsentrasi lisolesitin yang berasal dari hidrolisis lesitin kuning telur melalui gertakan enzim fosfolipase A di dalam lingkungan spermatozoa menyebabkan timbulnya efek toksik pada spermatozoa kambing (CORTEEL, 1980 dalam GALL, 1981). Padahal seharusnya gliserol mampu mencegah terjadinya efek negatif dari enzim fosfolipase A. Hal ini dapat dilihat dari reaksi pembentukan lesitin, dimana gliserol turut berperan didalamnya melalui aktivitas 1.2-diasil-sn-gliserol yang berasal dari asam fosfatidik (precursor diasil gliserol) dan selanjutnya menyerang gugus fosfat dari CDP-kolin melalui gugus C(3)-OH sehingga akan terbentuk lesitin (VOET dan VOET, 1990).

Tabel 4. Rataan persentase hidup spermatozoa dan penurunannya dari pengenceran sampai *thawing* pada berbagai dosis gliserol

Tahapan pengamatan	Dosis gliserol (%)		
	5	6	7
Sesudah pengenceran	79,36 ± 7,34 ^a	80,65 ± 5,30 ^a	79,51 ± 6,87 ^a
Sesudah ekuilibrasi	66,79 ± 6,65 ^a	72,00 ± 2,82 ^a	67,76 ± 6,15 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	52,00 ± 8,04 ^b	65,03 ± 6,02 ^a	52,10 ± 7,24 ^b
Penurunan dari pengenceran sampai <i>thawing</i>	27,36 ± 7,35 ^b	15,63 ± 2,38 ^a	27,40 ± 7,21 ^b

Keterangan : Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa

Penambahan gliserol ke dalam pengencer Tris belum mempengaruhi persentase MPU spermatozoa sebelum pembekuan (Tabel 5). Keadaan ini dapat memberikan gambaran bahwa gliserol belum memperlihatkan daya kerjanya dalam melindungi membran plasma spermatozoa. Kerusakan membran plasma terjadi selama proses pembekuan dan *thawing* diantara suhu -15 sampai -60°C (PARKS dan GRAHAM, 1992). Namun setelah *thawing*, penambahan gliserol sebesar 6% menghasilkan persentase MPU spermatozoa (45,63%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (37,60%) dan 7% (37,97%). Sedangkan penambahan gliserol 5% dan 7% tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

Dengan demikian dosis gliserol sebesar 6% dalam pengencer Tris telah mampu berinteraksi dengan membran plasma, yaitu dengan jalan melenturkan membran dan tidak mudah rapuh sehingga kerusakan karena retak yang tidak dapat dipulihkan kembali dapat diatasi. Hal ini didukung lagi bila dilihat dari tingkat penurunan persentase MPU spermatozoa dari pengenceran sampai *thawing* dimana tingkat penurunan persentase MPU spermatozoa pada penambahan gliserol 6% nyata ($P < 0,05$) lebih rendah dibandingkan pada penambahan gliserol 5% dan 7%.

Gliserol akan masuk ke dalam membran plasma dengan jalan menyeimbangkan konsentrasi intra dan ekstraseluler. Akibatnya air yang tadinya keluar dari membran dengan cara eksoosmosis, akan masuk kembali ke dalam membran dan selanjutnya akan menyeimbangkan kandungan air intra dan ekstraseluler sama seperti sebelum ada gliserol. Jadi respons membran plasma setelah dipaparkan dengan gliserol adalah terjadi pengeluaran air dari dalam sel terlebih dahulu, terjadi pengkerutan sel kemudian difusi gliserol ke dalam sel sehingga akhirnya ukuran sel spermatozoa kembali normal. Menurut ROBBINS *et al.* (1976) penambahan gliserol ke dalam larutan suatu sel akan mengurangi pemaparan sel terhadap larutan yang berkonsentrasi tinggi karena substansi ini tidak terkristalisasi, tetapi lebih dari itu membantu menjaga konsentrasi garam dalam larutan dari tingkat yang membahayakan selama pembekuan.

Gliserol dalam melindungi membran plasma akan mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga mengurangi ketidakstabilan membran dan berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein menyebabkan partikel-partikel antar membran terkumpul (PARKS dan GRAHAM, 1992). Selain itu, gliserol sebagai senyawa polar yang tidak bermuatan akan menyebabkan ekor sperma melingkar karena kemampuannya berpenetrasi ke dalam membran sel, menyebabkan air air masuk dan menyeimbangkan tekanan osmotik intra dan ekstraseluler (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

Tabel 5. Rataan persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dan penurunannya dari pengenceran sampai *thawing* pada berbagai dosis gliserol

Tahapan pengamatan	Dosis gliserol (%)		
	5	6	7
Sesudah pengenceran	72,83 ± 2,24 ^a	73,46 ± 4,63 ^a	73,35 ± 1,61 ^a
Sesudah ekuilibrasi	53,87 ± 5,34 ^a	57,56 ± 4,79 ^a	54,20 ± 7,91 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	37,60 ± 2,71 ^b	45,63 ± 4,90 ^a	37,97 ± 2,54 ^b
Penurunan dari pengenceran sampai <i>thawing</i>	35,23 ± 4,07 ^b	27,83 ± 6,20 ^a	35,39 ± 3,62 ^b

Keterangan : Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

Dari hasil penelitian ini pula terlihat bahwa penambahan gliserol sebesar 5% dan 7% ke dalam pengencer Tris menghasilkan persentase MPU spermatozoa sesudah *thawing* lebih rendah dibandingkan penambahan gliserol 6%. Hal ini menandakan dosis gliserol 5% dan 7% belum mampu melindungi membran plasma sehingga mengakibatkan terjadinya perubahan tekanan osmotik dalam membran plasma. Timbulnya gejala *osmotic shock* ini disebabkan pemaparan spermatozoa pada larutan hipotonik sesudah periode pemaparan pada kondisi hipertonic yang diinduksi melalui penambahan gliserol (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

Selain itu, tingginya kerusakan membran plasma spermatozoa sesudah *thawing* pada penambahan gliserol 5% dan 7% menunjukkan dosis gliserol tersebut belum mampu melindungi membran plasma dari efek peroksidasi lipid. Membran plasma spermatozoa kaya akan lemak tak jenuh sehingga rentan terhadap peroksidasi lipid (MAXWELL dan WATSON, 1996). Akibat dari peroksidasi lipid adalah terbentuknya peroksid lipid, yang akan bereaksi sebagai radikal bebas dan merangsang terjadinya reaksi otokatalitik, sehingga mengakibatkan rusaknya membran plasma (SINHA *et al.*, 1996).

Persentase tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan gliserol 5%, 6% dan 7% tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase TAU spermatozoa sebelum pembekuan (sesudah pengenceran dan ekuilib-rasi) (Tabel 6). Namun pasca pembekuan pengaruh gliserol sudah terlihat, dimana penambahan gliserol 6% menghasilkan persentase TAU (47,54%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (37%) dan 7% (37,14%) sesudah *thawing*. Sedangkan penambahan gliserol 5% dan 7% tidak memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Selain itu, tingkat penurunan persentase TAU dari pengenceran sampai *thawing* pada penambahan gliserol 6% (25,20%) lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan gliserol 5% (34,98%) dan 7% (35%). Hal ini berarti bahwa

penambahan gliserol 6% dapat memberikan perlindungan terhadap keutuhan akrosom. Dengan terpeliharanya tudung akrosom selama proses pembekuan maka diharapkan enzim-enzim tetap ada, sehingga daya fertilitas tinggi. Protein berupa enzim-enzim pada tudung akrosom memegang peranan penting dalam menginduksi reaksi akrosom dan interaksi dengan zona pelusida (SANCHEZ *et al.*, 1995).

Selama proses pembekuan berlangsung, spermatozoa mudah mengalami peroksidasi lipid, yang akan merusak sel spermatozoa. Bagian sel spermatozoa yang paling peka terhadap kerusakan peroksidasi endogenous dan eksogenous adalah bagian akrosom. Adanya gliserol yang berfungsi sebagai agen protektif akan menjaga keseimbangan konsentrasi fisiologik intra dan ekstraseluler dan tudung akrosom akan tetap utuh. Gliserol akan berinteraksi dengan membran plasma sehingga akan mengurangi kerusakan dari membran plasma dan tudung akrosom pada saat terjadi perubahan struktur dari relatif cair ke padat selama pembekuan atau yang lebih penting lagi pada saat pencairan kembali (FERADIS, 1999).

Dari penelitian ini pula terlihat bahwa dosis gliserol 5% dan 7% dalam pengencer Tris menghasilkan persentase TAU lebih rendah sesudah *thawing* dibandingkan dosis gliserol 6%. Hal ini menunjukkan bahwa daya perlindungan terhadap tudung akrosom pada dosis 5% dan 7% tidak efektif, menyebabkan enzim-enzim pelebur dinding ovum akan turut pula rusak. SINGH *et al.* (1996) menyatakan bila spermatozoa mamalia dibekukan, kerusakan sel akan terjadi menyebabkan terjadi pelepasan berbagai enzim hingga material lainnya. Selanjutnya dikatakan paling kurang ada dua enzim (hialuronidase dan akrosin) yang berperan penting dalam proses fertilisasi akan mudah rusak sehingga akan mengganggu proses fertilisasi.

Walaupun terdapat perbedaan yang nyata persentase TAU sesudah *thawing* pada penambahan gliserol 5%, 6% dan 7%, namun nilai yang diperoleh masih dalam kategori normal yaitu minimal 70% pada semen kambing (EVANS dan MAXWELL, 1987). DEKA dan RAO (1985) mendapatkan persentase TAU spermatozoa kambing sesudah *thawing* 86,17%.

Tabel 6. Rataan persentase tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa dan penurunannya dari pengenceran sampai *thawing* pada berbagai dosis gliserol

Tahapan pengamatan	Dosis gliserol (%)		
	5	6	7
Sesudah pengenceran	71,99 ± 1,69 ^a	72,74 ± 4,07 ^a	72,14 ± 1,59 ^a
Sesudah ekuilib-rasi	57,56 ± 3,57 ^a	62,58 ± 5,81 ^a	58,54 ± 3,09 ^a
Sesudah <i>thawing</i>	37,00 ± 2,87 ^b	47,54 ± 9,89 ^a	37,14 ± 4,06 ^b
Penurunan dari pengenceran Sampai <i>thawing</i>	34,98 ± 3,30 ^b	25,20 ± 6,76 ^a	35,00 ± 3,42 ^b

Keterangan : Nilai dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$)

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan bahwa penambahan gliserol 6% di dalam pengencer Tris berhasil melindungi spermatozoa dari berbagai cekaman selama proses kriopreservasi semen, sehingga dapat mempertahankan kualitas semen beku (motilitas, daya hidup, MPU dan TAU spermatozoa) yang layak dipakai dalam program IB pada kambing Peranakan Etawah. Perlu pengujian tentang kemampuan level gliserol 6% dalam pengencer Tris di lapangan yang dibuktikan dengan angka kebuntingan yang memadai setelah inseminasi buatan pada ternak kambing.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Proyek ARMP-II Badan Litbang Pertanian yang telah memberikan bantuan dana sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

Balai Penelitian Ternak Bogor dan Bagian Reproduksi dan Kebidanan FKH, IPB yang telah memberikan fasilitas dan kemudahan-kemudahan lainnya untuk melaksanakan kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- BARIL, G., B. LEBOEUF, and J. SAUMANDE. 1993. Synchronization of estrus in goat: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, 40 : 621-628.
- DEKA, B.C. and A.R. RAO. 1985. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. *Indian Vet. J.*, 62 : 414-417.
- EVANS, G. and W.M.C. MAXWELL. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, London.
- FARSTAD, W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Anim. Reprod. Sci.* 42 : 251-260.
- FERADIS. 1999. Penggunaan Antioksidan Dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus Pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- GALL, C. 1981. Goat Production. Academic Press, London.
- HAMMERSTEDT, R.H., J.K. GRAHAM, and P. NOLAN. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm : what we ask them to survive. *J. Androl.*, 11 : 73-88.
- KUMAR, S., K.L. SAHNI, and G. MOOHAN. 1992. Effect of different levels of glycerols and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.* 2 : 151-156.
- MAXWELL, W.M.C. and P.F. WATSON. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 42 : 55-65.
- MAZUR, P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. 9th International Congress on Animals Reproduction & AI. Vol. I, 99-114.
- MCLAUGHLIN, E.A., W.C.L. FORD, and M.G.R. HULL. 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J. Reprod. Fert.*, 95 : 749-754.
- PARKS, J.E. and J.K. GRAHAM. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 38 : 209-222.
- RITAR, A.J. and S. SALAMON. 1983. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. Biol. Sci.*, 36 : 49-59.
- ROBBINS, R.K., R.G. SAACKE and P.T. CHANDLER. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. *J. of Anim. Sci.*, 42 : 145-154.
- SANCHEZ, R., J. RISOPATRON, G. SEPULVEDA, P. PENA and W. MISHA. 1995. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa : effect of proteinase inhibitors. *Theriogenology*, 43 : 761-768.
- SINGH, M.P., A.K. SINHA, B.K. SINGH and R.L. PRASAD. 1996. Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 45 : 405-416.
- SINHA, M.P., A.K. SINHA, B.K. SINGH and R.L. PRASAD. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 41 : 237-243.
- SINHA, S., B.C. DEKA, M.K. TAMULU and B.N. BORGHAIN. 1992. Effect of equilibration period and glycerol level in tris extender on quality of frozen goat semen. *Indian Vet. J.*, 69 : 1107-1110.
- STEEL, R.G.D. and J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- SUPRIATNA, I. dan F.H. PASARIBU. 1992. *In Vitro* Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- TOELIHERE, M.R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak Mutiara, Bandung.
- TULL, R.K. and W. HOLTZ. 1994. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. *Theriogenology*, 42 : 547-555.
- VOET, D. and J.G. VOET. 1990. Biochemistry. John Wiley & Sons, New York.