

PERANAN ANTIOKSIDAN DALAM MENINGKATKAN KUALITAS SEMEN BEKU

MUHAMMAD RIZAL¹ dan HERDIS²

¹Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon 97233

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

(Makalah diterima 28 Januari 2010 – Revisi 30 Juni 2010)

ABSTRAK

Salah satu faktor yang menurunkan kualitas semen beku adalah tingginya aktivitas metabolisme oksidatif di dalam semen, akibat terbentuknya radikal bebas yang menyebabkan terjadinya reaksi peroksidasi lipida pada membran plasma spermatozoa. Reaksi peroksidasi lipida juga terjadi karena kontak antara semen dan udara bebas yang mengandung oksigen saat proses pengolahan semen. Untuk mencegah dan mengurangi reaksi peroksidasi lipida, ke dalam pengencer semen maka perlu ditambahkan senyawa antioksidan antara lain vitamin C, vitamin E, glutathione, dan β -karoten. Berdasarkan hasil beberapa penelitian dilaporkan bahwa penambahan berbagai antioksidan tersebut ke dalam pengencer mampu meningkatkan kualitas semen beku berbagai hewan ternak.

Kata kunci: Antioksidan, radikal bebas, peroksidasi lipida, semen beku

ABSTRACT

THE ROLE OF ANTIOXIDANT FOR IMPROVING THE QUALITY OF FROZEN SEMEN

The quality of frozen semen will be reduced if high oxidative metabolism activity in semen occurs, due to the formation of free radical compounds causing lipid peroxidation reaction on sperm plasma membrane. Lipid peroxidation occurs due to the exposure of semen to the oxygen during handling. Lipid peroxidation can be prevented by the addition of antioxidant compounds such as vitamin C, vitamin E, glutathione, and β -carotene, in the semen extender. Results of some researches showed that the addition of various antioxidants in extender can improve the quality of frozen semen of various animals.

Key words: Antioxidant, free radical, lipid peroxidation, frozen semen

PENDAHULUAN

Penerapan teknologi inseminasi buatan (IB) merupakan alternatif yang tepat guna dalam meningkatkan populasi ternak secara aktif progresif untuk menggantikan peran pejantan dalam perkawinan. Menurut TOELIHERE (2006) keberhasilan program IB ditentukan oleh empat faktor utama yaitu kualitas semen, kesuburan ternak betina, keterampilan teknisi dan pengetahuan zooteknik peternak. Keempat faktor tersebut tidak berdiri sendiri tetapi merupakan suatu kesatuan yang menentukan tingkat keberhasilan yang akan dicapai.

Kualitas semen sebagai salah satu faktor penting dalam keberhasilan IB dipengaruhi oleh proses pengolahan semen mulai dari penampungan, pengenceran, ekuilibrasi dan pembekuan semen. Selain itu, metode *thawing* yang digunakan oleh inseminator sangat berperan dalam menentukan kualitas semen yang akan diinseminasikan. Guna dapat dilakukan inseminasi buatan, kualitas semen beku setelah *thawing*

harus mempunyai motilitas minimal 40% (TOELIHERE, 1997).

Rendahnya kualitas semen beku umumnya disebabkan oleh kerusakan spermatozoa yang ditimbulkan karena penanganan proses pembekuan yang kurang tepat. Bagian paling kritis dari proses pembekuan semen adalah saat pembekuan itu sendiri dan *thawing*. Pada saat pembekuan, terjadi pengeluaran molekul air secara besar-besaran dari dalam sel yang mengakibatkan meningkatnya konsentrasi elektrolit intraseluler dan juga terbentuknya kristal-kristal es. Sedangkan pada saat *thawing*, semen mengalami tekanan yang berat akibat peningkatan suhu yang drastis. Selanjutnya, terjadi peningkatan aktivitas metabolisme, yang meningkatkan konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme. Radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup spermatozoa (SIREGAR, 1992). Semua dampak negatif ini akan mengakibatkan kerusakan pada organ-organ dan membran plasma sel yang menyebabkan rendahnya

motilitas dan daya hidup spermatozoa (MAXWELL dan WATSON, 1996).

Makalah ini bertujuan untuk membahas kerusakan spermatozoa akibat peroksidasi lipida dan peranan beberapa jenis senyawa antioksidan yang sudah dilaporkan dapat meningkatkan kualitas semen beku pada berbagai jenis hewan dan ternak.

KERUSAKAN SPERMATOZOA AKIBAT REAKSI PEROKSIDASI LIPIDA

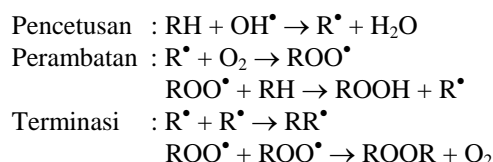
Komposisi membran plasma sel spermatozoa berhubungan dengan tingkat kerentanan spermatozoa terhadap cekaman dingin (*cold shock*), terutama kandungan lipida. Spermatozoa dari spesies yang mempunyai nisbah asam lemak tak jenuh dan asam lemak jenuh yang tinggi pada fosfolipida membran plasma cenderung lebih sensitif terhadap cekaman dingin. Kerentanan terhadap cekaman dingin juga berhubungan dengan nisbah kolesterol dan fosfolipida. Semakin rendah nisbah antara kolesterol dan asam lemak tak jenuh, semakin rentan membran plasma terhadap cekaman dingin (QUINN *et al.*, 1980).

Menurut DARRIN-BENNETT *et al.* (1973) kandungan kolesterol spermatozoa berbagai jenis hewan dan manusia berbeda, yang berakibat terhadap perbedaan tingkat kerentanan masing-masing spermatozoa dalam proses pengolahan semen. Spermatozoa kelinci dan manusia masing-masing mengandung 545 dan 555 μg kolesterol/1000 juta sel, kira-kira dua kali lebih tinggi daripada spermatozoa domba (266 μg /1000 juta sel) dan sapi (300 μg /1000 juta sel). Kandungan kolesterol spermatozoa dalam setiap kelompok ternak digambarkan dalam nisbah molar fosfolipida dan kolesterol, yaitu 0,4 untuk domba dan sapi, dan satu untuk kelinci dan manusia. Spermatozoa yang memiliki kandungan kolesterol lebih tinggi dan derajat asam lemak tak jenuh lebih rendah, akan mempunyai struktur membran plasma yang lebih kompak dan cenderung lebih resisten terhadap pengaruh cekaman dingin.

Menurut JONES *et al.* (1979) serta MAXWELL dan WATSON (1996) membran plasma sel spermatozoa kaya akan asam lemak tak jenuh (asam linoleat, linolenat, dan arakidonat) sehingga rentan terhadap kerusakan akibat reaksi peroksidasi lipida.

Dalam proses pembekuan dalam pembuatan semen beku, terjadi kontak antara semen dan oksigen. Menurut SIREGAR (1992) oksigen merupakan suatu unsur yang esensial, tetapi eksek atau kelebihan oksigen menyebabkan kerusakan peroksidatif. Peroksidasi lipida terjadi akibat adanya radikal bebas, yaitu senyawa kimia yang memiliki elektron tak berpasangan dan bersifat sangat reaktif. Radikal bebas antara lain berupa superoksida (O_2^\bullet), hidroksil (OH^\bullet) dan peroksil (ROO^\bullet). Di dalam tubuh, senyawa reaktif

ini dapat berasal dari produk samping rantai pernafasan di dalam mitokondria. Oksigen yang masuk ke dalam tubuh sekitar 90% masuk ke mitokondria. Pada saat proses respirasi di mitokondria, oksigen terlibat dalam pembentukan ATP dengan mengikutsertakan enzim-enzim respirasi. Dalam proses respirasi, oksigen mengalami reduksi dalam rangkaian elektron transfer di dalam mitokondria. Proses reduksi oksigen tersebut dapat menghasilkan radikal bebas dan hidrogen peroksida sebagai senyawa antara. Selanjutnya dinyatakan bahwa radikal bebas bersifat sangat reaktif, jika bereaksi dengan asam lemak tak jenuh akan menghasilkan lipid peroksida. Reaksi ini terjadi secara berantai dan berlangsung terus menerus karena setiap reaksi menghasilkan radikal bebas baru yang mengakibatkan reaksi peroksidasi lipida yang baru, sehingga disebut sebagai reaksi rantai atau reaksi autokatalitik (Gambar 1).



Gambar 1. Mekanisme autooksidasi

Sumber : SIREGAR, (1992)

Radikal bebas seperti hidroksil dan singlet oksigen dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting dalam mempertahankan integritas sel. Ketiga senyawa itu adalah asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen utama fosfolipida penyusun membran plasma sel; DNA, yang merupakan perangkat genetik sel; dan protein, yang memegang berbagai peranan penting sebagai enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matriks, dan sitoskeleton. Proses reaksi peroksidasi lipida merubah struktur spermatozoa terutama pada bagian akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat, dan pelepasan komponen intraseluler (JONES dan MARTIN, 1973) dan bila terjadi pada spermatozoa yang disimpan lama akan dapat menurunkan daya tahan spermatozoa selama proses pengawetan semen berlangsung (ALVAREZ dan STOREY, 1982).

Menurut HAMMERSTEDT (1993), struktur matriks lipida akan mengalami kerusakan apabila terjadi reaksi rantai peroksidasi lipida yang berkepanjangan, menyebabkan instabilitas membran plasma sel. Kerusakan minimum adalah mengubah viskositas (kekentalan) membran plasma sel dan merangsang aktivitas enzim fosfolipase A_2 . Peningkatan kerusakan juga dapat terjadi pada sistem non-membran dimana jika spermatozoa tidak dapat melakukan biosintesis untuk memperbaiki kerusakan, maka akan menyebabkan gangguan pada fungsi biologik spermatozoa.

Jenis dan peranan antioksidan dalam meningkatkan kualitas semen beku

Menurut HALLIWELL dan GUTTERIDGE (1990), antioksidan adalah suatu senyawa yang pada konsentrasi rendah dihadapkan pada substrat yang dapat dioksidasi dan secara nyata menunda atau menghambat oksidasi dari substrat tersebut. Sehingga antioksidan berfungsi melindungi sistem biologi terhadap suatu efek yang berpotensi merusak dari suatu proses atau reaksi yang menyebabkan oksidasi yang meluas (LENZI *et al.*, 2002). Antioksidan merupakan senyawa nukleofilik atau yang mempunyai kemampuan mereduksi, memadamkan atau menekan reaksi radikal bebas.

Berdasarkan dua mekanisme pencegahan dampak negatif senyawa oksidan, senyawa antioksidan dapat dibagi menjadi dua golongan, yakni antioksidan pencegah timbulnya senyawa-senyawa oksidan secara berlebihan dan antioksidan pemutus rantai reaksi untuk mencegah reaksi-reaksi berlanjut. Senyawa antioksidan yang tergolong sebagai pencegah reaksi adalah katalase, glutathion peroksidase, glutathion, dan sistein yang berfungsi sebagai antioksidan pemutus reaksi rantai adalah vitamin E (tokoferol), vitamin C (asam askorbat), β -karoten, glutathion, dan sistein (SURYOHUDOYO, 2000).

Penambahan vitamin C dan vitamin E di dalam pengencer semen

Penambahan vitamin C di dalam pengencer dapat memperbaiki kualitas semen beku sapi (BECONI *et al.*, 1993), semen beku kerbau lumpur (SUMARSONO, 1998), dan semen beku kelinci (YOUSEF *et al.*, 2003) terutama dalam persentase hidup dan keutuhan membran plasma spermatozoa. Namun demikian, penambahan vitamin C di dalam pengencer semen harus memperhatikan perubahan pH yang akan terjadi, karena vitamin C bersifat asam. Spermatozoa sangat peka terhadap perubahan pH medium dari keadaan netral, terutama terhadap pH rendah (SUMARSONO, 1998).

Penambahan 0,2 gram/100 ml vitamin E di dalam pengencer mampu meningkatkan kualitas semen beku domba St. Croix (FERADIS, 1999), semen beku kambing Peranakan Etawah (WERDHANY *et al.*, 2000), dan semen beku domba Garut (HERDIS *et al.*, 2002). Akan tetapi, penambahan vitamin E di dalam pengencer semen harus diperhatikan kelarutannya. Hal ini disebabkan karena vitamin E tidak larut di dalam air. Untuk mengatasi hal ini umumnya sebelum ditambahkan ke dalam pengencer semen, vitamin E terlebih dahulu dilarutkan di dalam etanol dengan perbandingan antioksidan: etanol sebesar 1 : 5 (HERDIS *et al.*, 2002).

Penambahan glutathion di dalam pengencer semen

Glutathion ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$, γ Glu-CysH-Gly, tripeptida atau GSH, BM 307, 33 g/mol) adalah salah satu antioksidan yang mempunyai peranan dalam melindungi sel dari kerusakan akibat sifat toksik yang disebabkan oleh jenis oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS) (TAKAHASHI *et al.*, 1997; LENZI *et al.*, 2002). Glutathion dapat mengurangi terjadinya reaksi reduksi-oksidasi (redoks) di dalam sel yang menyebabkan rusaknya DNA akibat meningkatnya konsentrasi hidrogen peroksida. Glutathion juga memegang peranan penting sebagai modulator homeostasis seluler, meliputi detoksifikasi metal dan oksiradikal (RINGWOOD dan CONNERS, 2000). Selanjutnya, dinyatakan bahwa glutathion dapat menonaktifkan metal toksik dan menurunkan interaksi antara metal dengan proses-proses kimiawi yang esensial. Menurut HOLT (2000a), glutathion berfungsi mencegah terjadinya peroksidasi lipida membran plasma sel spermatozoa selama proses pembekuan semen, sehingga dapat meningkatkan motilitas dan integritas akrosom setelah *thawing*. Menurut BOQUEST *et al.* (1999), glutathion juga berfungsi dalam proses transpor asam amino, sintesis DNA dan protein, serta menurunkan ikatan disulfida.

Glutathion mampu menetralkan kerja radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif (SIKKA, 1996; SURYOHUDOYO, 2000; TUMINAH, 2000) sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya. Selanjutnya, dinyatakan bahwa glutathion bersifat hidrofilik dan berperan di dalam sitosol (SIKKA, 1996; SURYOHUDOYO, 2000; TUMINAH, 2000) yang digunakan dalam pengencer semen beku.

RAIJMAKERS *et al.* (2003) melaporkan glutathion memegang peranan dalam fertilitas, sebab konsentrasi glutathion di dalam plasma semen jantan fertil lebih tinggi dibandingkan dengan yang subfertil. Selanjutnya, dinyatakan bahwa konsentrasi glutathion yang lebih tinggi dapat meningkatkan atau menjaga kualitas morfologi dan motilitas spermatozoa. Hal yang sama dilaporkan UCKUN *et al.* (2002) bahwa menurunnya konsentrasi glutathion di dalam plasma semen akan menyebabkan rendahnya fertilitas spermatozoa dari manusia.

Hasil penelitian POMARES *et al.* (1994) yang dilaporkan oleh LEBOEUF *et al.* (2000) menyatakan bahwa penambahan glutathion sebanyak 1 unit/ml dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa domba dan kambing pada suhu penyimpanan 5°C. Sedangkan EARL *et al.* (1997) melaporkan bahwa penambahan glutathion sebanyak 0,3 mg/ml media pada semen beku yang telah dicairkan kembali dapat meningkatkan persentase blastosis sapi dibandingkan dengan tanpa penambahan glutathion. GADEA *et al.* (2000) melaporkan bahwa penambahan 1 mM dan 5 mM

glutation ke dalam semen beku yang telah di-*thawing* meningkatkan persentase penetrasi terhadap oosit dan persentase pembentukan pronukleus jantan dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan kemampuan penetrasi spermatozoa babi terhadap oosit dengan penambahan 0,25 mM glutation juga dilaporkan oleh BOQUEST *et al.* (1999). Hal ini disebabkan karena glutation dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat serangan radikal bebas.

Menurut SLAWETA dan LASKOWSKA (1987) terjadi peningkatan motilitas spermatozoa semen beku sapi dari 30,3% menjadi 33,1% dengan penambahan 5 mM (0,15% w/v) glutation di dalam pengencer susu. SINHA *et al.* (1996) melaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa semen beku kambing rata-rata 47,8% pada semen yang diencerkan dengan pengencer Tris tanpa glutation. Nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan semen yang diencerkan dengan pengencer Tris + 2 mM glutation (48,9%) dan yang diencerkan dengan pengencer Tris + 5 mM glutation (53,64%). Menurut UCKUN *et al.* (2002) penambahan glutation ke dalam medium pengencer semen efektif memproteksi motilitas progresif spermatozoa.

Penelitian pada domba Garut menunjukkan bahwa penambahan sampai 0,1% w/v glutation di dalam pengencer Tris nyata meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, membran plasma utuh (MPU), dan tudung akrosom utuh (TAU) semen setelah *thawing* adalah masing-masing rata-rata 53,3, 59,67, 54 serta 56,44%. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak ditambahkan glutation, yakni masing-masing rata-rata 46,67, 52,33, 48,44 dan 47,11% (RIZAL *et al.*, 2002). Penambahan glutation di dalam pengencer mampu menghasilkan semen beku dengan kualitas baik karena glutation berfungsi sebagai senyawa antioksidan yang mencegah terjadinya reaksi peroksidasi lipida pada membran plasma spermatozoa selama proses pengolahan semen, sehingga membran plasma tetap dalam keadaan utuh. Dengan demikian, spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh mampu dengan baik mengatur lalu lintas keluar masuk semua substrat dan elektrolit pada tingkat sel, sehingga proses metabolisme termasuk fruktolisis dan siklus Krebs dapat berlangsung dengan baik. Proses metabolisme ini menghasilkan ATP yang mengandung energi sehingga motilitas dan daya hidup spermatozoa tetap dapat dipertahankan. Membran plasma sel yang utuh juga akan melindungi vesikel akrosom yang berada tepat di bawah membran plasma sel di bagian ujung kepala spermatozoa dari perusakan secara mekanik, sehingga vesikel akrosom tetap utuh dan nilai persentase TAU pun meningkat (RIZAL *et al.*, 2002).

Glutation (GSH) dapat mencegah reaksi peroksidasi lipida pada membran plasma sel dengan dua mekanisme sebagai berikut:

Jika glutation menonaktifkan hidrogen peroksida (H_2O_2), akan terjadi reaksi sebagai berikut: $GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$. Hidrogen peroksida memang bukan radikal bebas, akan tetapi sebagai salah satu zat oksidan, dia juga dapat menimbulkan akibat yang sama dengan akibat yang ditimbulkan oleh radikal bebas.

Jika glutation menonaktifkan radikal bebas hidroksil ($\cdot OH$) yang dikenal sebagai salah satu jenis senyawa oksigen reaktif yang paling berbahaya, akan terjadi reaksi sebagai berikut: $GSH + \cdot OH \rightarrow H_2O + GS\cdot$ (radikal glutation) dan $GS\cdot + GS\cdot \rightarrow GSSG$ (glutation teroksidasi). Reaksi yang ditimbulkan oleh radikal bebas pada membran plasma sel (terutama pada asam lemak tak jenuh) akan membentuk radikal bebas yang baru, yang jika bertemu dengan molekul lain akan terjadi lagi reaksi dan membentuk radikal bebas baru juga. Demikian seterusnya sehingga terjadi reaksi berantai (*chain reaction*), dan apabila ini terjadi pada membran plasma sel, reaksi itu akan berhenti jika seluruh membran plasma sel telah mengalami kerusakan atau dihentikan dengan cara menambahkan senyawa antioksidan. Pada bagan tersebut di atas terlihat bahwa reaksi akan berhenti karena dua radikal glutation ($GS\cdot$) akan bereaksi membentuk glutation teroksidasi (GSSG) (SURYOHUDOYO, 2000).

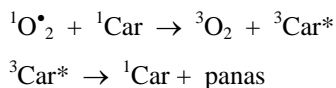
Pemanfaatan β -karoten di dalam pengencer semen

Pemanfaatan β -karoten ($C_{40}H_{56}$, BM 536,89 g/mol) sebagai salah satu komponen penyusun pengencer semen belum banyak dilaporkan. Akan tetapi mengingat fungsinya sebagai salah satu senyawa antioksidan, maka pemakaian senyawa tersebut dalam upaya meningkatkan kualitas semen yang akan diolah sangat dimungkinkan. Menurut SURYOHUDOYO (2000), β -karoten merupakan salah satu senyawa antioksidan yang larut dalam lemak dan berfungsi memutus reaksi rantai peroksidasi lipida yang terjadi pada membran plasma sel.

Penambahan 0,002% l/v β -karoten meningkatkan kualitas semen beku domba Garut secara nyata. Persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, MPU, dan TAU semen yang telah di-*thawing* masing-masing sebesar 50,55; 56,78; 53,78 dan 51%. Nilai ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang tidak ditambahkan β -karoten, yakni masing-masing sebesar 46,67; 52,33; 48,44 dan 47,11%. Penambahan sebanyak 0,003% b/v β -karoten menghasilkan kualitas semen beku yang lebih rendah dibandingkan dengan 0,002% (RIZAL, 2005).

Singlet oksigen merupakan salah satu jenis senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan dari proses biologik aerobik yang terjadi secara alamiah dan

berbahaya terhadap kelangsungan hidup sel. Singlet oksigen mampu merusak sel karena dapat menimbulkan reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel dan sekaligus juga mampu merusak organ-organ sel lainnya (OSHIMA *et al.*, 1993). β -karoten (^1Car) meredam daya rusak singlet oksigen ($^1\text{O}_2$) melalui mekanisme fisik (Gambar 2), dengan cara mentransfer energi dari singlet oksigen ke β -karoten yang memiliki struktur kaya elektron. β -karoten menjadi lebih aktif setelah mendapat tambahan energi dengan berubah struktur menjadi bentuk triplet ($^3\text{Car}^*$). Setelah itu, β -karoten triplet tersebut akan melepaskan sebagian energi dalam bentuk panas dan selanjutnya kembali ke struktur semula (^1Car). Akibat mekanisme kerjanya berlangsung secara fisik, maka struktur β -karoten tidak mengalami perubahan setelah bekerja, sehingga masih memiliki kemampuan memproteksi sel dari serangan singlet oksigen berikutnya



Gambar 2. Mekanisme kerja β -karoten dalam mencegah peroksidasi lipida

Sumber: OSHIMA *et al.* (1993)

Senyawa toksik yang dihasilkan akibat reaksi peroksidasi lipida

HEMACHAND dan SHAHA (2003) serta SURYOHUDOYO (2000) mengungkapkan bahwa akibat yang ditimbulkan reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel adalah terputusnya rantai asam lemak menjadi berbagai senyawa yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa-senyawa ini merupakan berbagai macam aldehida seperti malondialdehid (MDA) dan 9-hidroksi-nonenal (HNE), serta bermacam-macam hidrokarbon seperti etana (C_2H_6) dan pentana (C_5H_{12}). Dengan demikian, semakin tinggi konsentrasi MDA, HNE, etana, atau pentana di dalam suatu sampel semen menunjukkan semakin tinggi tingkat kerusakan asam lemak tak jenuh fosfolipida pada membran plasma sel spermatozoa, yang diakibatkan oleh reaksi rantai peroksidasi lipida.

FERADIS (1999) melaporkan bahwa konsentrasi MDA semen beku domba St. Croix menurun dengan menambahkan senyawa antioksidan vitamin E (α -tokoferol) di dalam pengencer semen. Konsentrasi MDA pada perlakuan penambahan 0,1% vitamin E sebanyak 2,63 nmol MDA/ml dan perlakuan penambahan 0,2% vitamin E sebanyak 2,5 nmol MDA/ml nyata lebih rendah dibandingkan dengan tanpa penambahan vitamin E, yakni sebanyak 3,3 nmol MDA/ml. Hal yang sama dilaporkan SLAWETA dan

LASKOWSKA (1987) serta SINHA *et al.* (1996) bahwa terjadi penurunan konsentrasi aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), dan laktat dehidrogenase (LDH) pada semen beku sapi dan kambing yang ditambahkan 2 mM dan 5 mM glutation dibandingkan dengan tanpa penambahan glutation (kontrol). AST, ALT, dan LDH merupakan enzim-enzim yang keluar dari kepala sel spermatozoa akibat rusaknya akrosom. Ini berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi enzim-enzim tersebut di dalam sampel semen, menunjukkan semakin banyak spermatozoa yang mengalami kerusakan pada bagian akrosomnya. Membran plasma sel adalah pelindung bagian paling luar sel spermatozoa yang jika mengalami kerusakan akan mengurangi kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur.

Penambahan glutation (RIZAL *et al.*, 2002) dan β -karoten (RIZAL, 2005) di dalam pengencer Tris mampu menurunkan konsentrasi MDA semen beku domba Garut dibandingkan dengan tanpa penambahan antioksidan. Hasil penelitian pada perlakuan penambahan 0,05; 0,1 dan 0,15% glutation menyebabkan rata-rata konsentrasi MDA semen beku sebanyak 2,69; 2,92; 2,74 mg MDA/kg (RIZAL *et al.*; 2002). Konsentrasi MDA pada perlakuan penambahan 0,001; 0,002; 0,003% β -karoten adalah sebanyak 3,37; 3,8 dan 4,61 mg MDA/kg (RIZAL, 2005). Nilai-nilai ini nyata lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan tanpa penambahan antioksidan, yakni sebanyak 5,24 mg MDA/kg.

KESIMPULAN

Reaksi peroksidasi lipida pada membran plasma sel spermatozoa selama proses pengolahan semen merupakan faktor utama yang menyebabkan rendahnya kualitas semen beku. Keadaan ini terjadi akibat kontak antara semen dengan oksigen yang menyebabkan meningkatnya aktivitas metabolisme oksidatif yang menghasilkan peningkatan jumlah radikal bebas. Antioksidan merupakan senyawa yang digunakan untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh aktivitas radikal bebas. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan antioksidan seperti vitamin C, vitamin B, glutation dan β -karoten ke dalam pengencer semen dapat meningkatkan kualitas semen beku yang dihasilkan melalui pencegahan kerusakan pada akrosom.

DAFTAR PUSTAKA

- ALVAREZ, J.G. and B.T. STOREY. 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27: 1102 – 1108.

- BECONI, M.T., C.R. FRANCA, N.G. MORA and M.A. AFFRANCHINO. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40: 841 – 851.
- BOQUEST, L., R. ABEYDEERA, W.H. WANG and B.N. DAY. 1999. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*. *Theriogenology* 51: 1311 – 1319.
- DARRIN-BENNETT, A, A. POULOS and I.G. WHITE. 1973. The effect of cold shock on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:1409 – 1420.
- DE MATOS, D.G. and C.C. FURNUS. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation on embryo development. Effect of beta-mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53: 761 – 771.
- EARL, C.R., J. KELLY, J. ROWE and D.T. ARMSTRONG. 1997. Glutathione treatment of bovine sperm enhances *in vitro* blastocyst production rates. *Theriogenology* 47: 255 (Abstract).
- 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. 161 hlm.
- FOOTE, R.H., C.C. BROCKETT and M.T. KAPROTH. 2002. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 71: 1.
- GADEA, J., E. SELLES, S. RUIZ, P. COY, R. ROMAR, C. MATAS and I. CAMPOS. 2000. Effect of the presence of glutathione in the thawing diluent on the penetrability capacity of porcine oocytes *in vitro*. Proc. 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm 2 – 6 July 2000.2: 139 (Abstract).
- GOPALAKRISHNAN, B. and C. SHAHA. 1998. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Letters* 422: 296 – 300.
- HALLIWELL, B. and J.M.C. GUTTERIDGE. 1990. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- HAMMERSTEDT, R.H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod. Fertil. Dev.* 5: 675 – 690.
- HEMACHAND, T. and C. SHAHA. 2003. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. The Journal for rapid publication of short report in molecular biosciences. Elsevier on *FEBS Letters* 26999: 1 – 5.
- HERDIS, I. KUSUMA, M. SURACHMAN, M. RIZAL, I.K. SUTAMA, I. INOUNU, B. PURWANTARA dan R.I. ARIFANTINI. 2002. Peningkatan kualitas semen beku domba Garut melalui penambahan α -tokoferol ke dalam pengencer susu skim kuning telur. *JITV* 7: 12 – 17.
- HOLT, W.V. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3 – 22.
- HOLT, W.V. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47 – 58.
- HSU, P.C. and Y.L. GUO. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology* 180: 23 – 44.
- JONES, R.C. and I.C.A. MARTIN. 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35: 311 – 320.
- JONES, R.C., T. MANN and R.J. SHERRINS. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.* 31: 531 – 537.
- LEBOEUF, B., B. RESTALL and S. SALAMON. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113 – 141.
- LENZI, A., L. GANDINI, F. LOMBARDO, M. PICARDO, V. MARESCA, E. PANFILI, F. TRAMER, C. BOITANI and F. DONDERO. 2002. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and glutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 65: 301 – 304.
- MAXWELL, W.M.C. and P.F. WATSON. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 55 – 65.
- OSHIMA, S., F. OJIMA, H. SAKAMOTO, Y. ISHIGURO and J. TERAO. 1993. Inhibitory effect of β -carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 39: 607 – 615.
- QUINN, P.J., Y.W. CHOW and I.G. WHITE. 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60: 403 – 407.
- RAIJMAKERS, M.T.M., H.M.J. ROELOFS, E.A.P. STEEGERS, R.P.M. STEEGERS-THEUNISSEN, T.P.J. MULDER, M.F.C.M. KNAPEN, W.Y. WONG and W.H.M. PETERS. 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.
- RINGWOOD, A.H. and D.E. CONNERS. 2000. The effects of glutathione depletion on reproductive success in oysters, *Crassostrea virginica*. *Mar. Environ. Res.* 50: 207 – 211.

- RIZAL, M. 2005. Efektivitas berbagai konsentrasi β -karoten terhadap kualitas semen beku domba garut. *J. Anim. Prod.* 7: 6 – 13.
- RIZAL, M., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan P. SITUMORANG. 2002. Efektivitas berbagai konsentrasi glutathione terhadap kualitas semen yang telah dibekukan pada domba Garut. *J. Biosains* 7: 22 – 28.
- SCHWEIGERT, F.J. and H. ZUCKER. 1988. Concentration of vitamin A, β -carotene and vitamin E in individual bovine follicles of different quality. *J. Reprod. Fertil.* 82: 575 – 579.
- SIKKA, S.C. 1996. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience* 1: 78 – 86.
- 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 goat semen. *Anim. Reprod. Sci.* 41: 237 – 243.
- SIREGAR, P. 1992. Metabolit oksigen radikal bebas dan kerusakan jaringan. *Cermin Dunia Kedokteran* 80: 112 – 115.
- SLAWETA, R. and T. LASKOWSKA. 1987. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 13: 249 – 253.
- SUMARSONO, T. 1998. Peningkatan Kualitas Spermatozoa Kerbau Lumpur dengan Penambahan Asam Askorbat dalam Pengencer Semen Beku. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SURYOHUDOYO, P. 2000. Oksidan, antioksidan, dan radikal bebas. *Dalam: Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler.* SURYOHUDOYO, P. CV Sagung Seto, Jakarta. hlm 31 – 47.
- TAKAHASHI, M., N. SAKA, Y. KANAI and A. OKANO. 1997. Depletion of glutathione causes DNA damage and increase of hydrogen peroxide levels in bovine embryos. *Theriogenology* 47: 321 (Abstrak).
- TOELIHERE, M.R. 1997. Peranan bioteknologi reproduksi dalam pembinaan produksi peternakan di Indonesia. Disampaikan pada Pertemuan Teknis dan Koordinasi Produksi (PERTEKSI) Peternak Nasional Tahun Anggaran 1997/1998. Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian. Cisarua, Bogor, 4 – 6 Agustus 1997.
- TOELIHERE, M.R. 2006. Pokok-pokok pikiran tentang perkembangan (bio) teknologi reproduksi di masa lalu, masa kini, dan masa yang akan datang dalam menunjang pembangunan peternakan di Indonesia. *Dalam: Peranan Bioteknologi Reproduksi dalam Pembangunan Peternakan dan Perikanan di Indonesia.* ACHJADI R.K., M. RIZAL, HERDIS, dan T. SAILI (Eds.) Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor. hlm 9 – 15.
- TUMINAH, S. 2000. Radikal bebas dan antioksidan, kaitannya dengan nutrisi dan penyakit kronis. *Cermin Dunia Kedokteran* 128: 49 – 51.
- UCKUN, F.M., X.P. LIU and O.J. D'CRUZ. 2002. Human sperm immobilizing activity of aminophenyl arsenic acid and its N-substituted quinazoline, pyrimidine, and purine derivatives: protective effect of glutathione. *Reprod. Toxicol.* 16: 57 – 64.
- WERDHANY, I.W., M.R. TOELIHERE, I. SUPRIATNA dan I.K. SUTAMA. 2000. Efek pemberian berbagai konsentrasi α -tokoferol sebagai antioksidan dalam pengencer Tris sitrat terhadap motilitas sperma kambing peranakan Etawah. Pros. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Bogor, 18 – 19 Oktober 1999. Puslitbang Peternakan, Bogor. Hlm. 244 – 252.
- YOUSEF, M.I., G.A. ABDALLAH and K.I. KAMEL. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim. Reprod. Sci.* 76: 99 – 111.