

# Efektivitas Berbagai Konsentrasi $\beta$ -Karoten terhadap Kualitas Semen Beku Domba Garut

(Effectivity of Various  $\beta$ -Carotene Concentration on Quality of Frozen-Thawed Semen of Garut Rams)

Muhammad Rizal

Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Ambon

## Abstract

The purpose of this research was to evaluate the quality of frozen-thawed semen of Garut rams that cryopreserved with Tris extender containing the various  $\beta$ -carotene concentrations. Semen was collected from four mature Garut rams using artificial vagina once a week. Immediately after initial evaluation, semen was divided into four parts and diluted with Tris extender containing 5% glycerol + 0% (control), 0.001% (Kt0.001), 0.002% (Kt0.002), and 0.003% (Kt0.003)  $\beta$ -carotene, respectively. Semen was loaded in 0.25 ml mini straw with the concentration of 200 million motile sperm. Semen was equilibrated at 5°C for three hours, then frozen and stored in liquid nitrogen container for 7 days. Quality of processed-semen including motility, live sperm, intact acrosomal cap (IAC), and intact plasma membrane (IPM) were evaluated after diluted, equilibrated, and thawed, respectively. Concentration of malondialdehyde (MDA) semen after thawing were evaluated. Data were analyzed as completely randomized design with four treatments and nine replicates. Means values were compared by least significant difference test at 0.05 significant level. Results indicated that mean value of post thawing motility and live sperm for Kt0.002 (50.55% and 56.78%) were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than Kt0.001 (46.11% and 52.89%), Kt0.003 (46.67% and 53.33%) and control (46.67% and 52.33%). Mean value of post thawing IAC and IPM for Kt0.002 (51.00% and 53.78%) were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than control (47.11% and 48.44%), but not significantly different with Kt0.001 (49.00% and 50.00%), and Kt0.003 (48.89% and 49.67%). MDA concentration of frozen-thawed semen for Kt0.001 (3.37 mg/kg), Kt0.002 (3.80 mg/kg), and Kt0.003 (4.61 mg/kg) were significantly lower ( $P < 0.05$ ) than control (5.24 mg/kg). In conclusion, concentration of 0.002%  $\beta$ -carotene in Tris extender is the optimal dose in improving frozen semen quality of garut rams.

**Key Words:**  $\beta$ -carotene, frozen-thawed semen, intact plasma membrane, MDA, Garut Rams.

## Pendahuluan

Penerapan teknologi inseminasi buatan (IB) pada ternak kecil khususnya ternak domba di Indonesia hingga saat ini tidak seintensif dengan pada ternak sapi. Hal ini disebabkan karena berbagai faktor, seperti tidak meratanya populasi domba di Indonesia, faktor teknis pelaksanaan IB yang lebih rumit (terutama kesulitan saat pendeposisian semen melewati cervix) dibanding dengan sapi, serta penyediaan semen beku domba yang relatif sedikit dan kualitas yang rendah. Rendahnya kualitas semen beku domba lebih disebabkan kerusakan spermatozoa akibat kurang baiknya proses kriopreservasi. Bagian paling kritis dari proses kriopreservasi semen adalah saat pembekuan dan *thawing*. Pada saat pembekuan

terjadi pengeluaran molekul air secara besar-besaran dari dalam sel yang mengakibatkan meningkatnya konsentrasi elektrolit intraseluler, dan terbentuknya kristal-kristal es. Sedangkan pada saat *thawing*, semen mengalami tekanan yang berat akibat peningkatan suhu yang drastis dan kontak dengan oksigen. Dampak negatif ini akan mengakibatkan kerusakan pada organel-organel dan membran plasma sel spermatozoa yang menyebabkan rendahnya kualitas semen beku.

Pada saat *thawing* semen beku, terjadi kontak antara semen dengan oksigen yang memungkinkan terbentuknya senyawa-senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil dan singlet oksigen. Pada saat yang bersamaan, juga terjadi peningkatan suhu semen yang drastis sehingga memacu tingkat metabolisme spermatozoa yang juga berarti

meningkatkan konsentrasi radikal bebas sebagai salah satu produk metabolisme. Radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Hal ini disebabkan radikal bebas memiliki sifat yang sangat reaktif untuk memperoleh elektron. Radikal bebas akan menyerang dan mengambil elektron dari asam lemak tak jenuh yang banyak menyusun fosfolipida membran plasma sel, yang kalau tidak dicegah akan terjadi reaksi otokatalitik (reaksi rantai) dan pada akhirnya merusak seluruh fosfolipida membran plasma sel spermatozoa. Untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, 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.

Peningkatan kualitas spermatozoa dengan menambahkan senyawa antioksidan di dalam pengencer semen telah banyak dilaporkan, seperti vitamin C pada semen beku sapi (Beconi *et al.*, 1993) dan semer kelinci (Yousef *et al.*, 2003); vitamin E dan butylated hydroxytoluene (BHT) pada semen beku domba st. croix (Feradis, 1999);  $\alpha$ -tokoferol pada semen beku kambing peranakan etawah (Werdhany *et al.*, 2000), semen beku domba garut (Herdis *et al.*, 2002), dan semen kelinci (Yousef *et al.*, 2003); serta glutathione pada semen beku sapi (Slaweta dan Laskowska, 1987), semen beku kambing (Sinha *et al.*, 1996), dan semen beku domba garut (Rizal *et al.*, 2004).

Menurut Pryor *et al.* (2000)  $\beta$ -karoten merupakan salah satu senyawa yang memiliki kemampuan kerja sebagai senyawa antioksidan yang baik. Ini ditunjukkan dengan percobaan terapi  $\beta$ -karoten di dalam makanan pada manusia yang dapat menurunkan kadar lipida peroksida serum, malondialdehid serum, low-density lipoprotein (LDL) yang diinduksi oleh ion Cu, kerusakan DNA, dan pirimidin teroksidasi. Menurut Oshima *et al.*, (1993)  $\beta$ -karoten memiliki kemampuan memproteksi liposom (suatu vesikel yang memiliki fosfolipida bilayer tunggal) dari

kerusakan akibat serangan singlet oksigen. Sedangkan menurut Suryohudoyo (2000)  $\beta$ -karoten merupakan salah satu senyawa antioksidan yang larut dalam lemak dan bekerja memutus reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel. Namun demikian, sepanjang pengetahuan penulis, belum pernah dilaporkan penggunaan  $\beta$ -karoten tersebut sebagai senyawa aditif di dalam pengencer dengan tujuan untuk meningkatkan kualitas semen beku, sehingga perlu dikaji lebih mendalam.

## Metode Penelitian

### Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah empat ekor pejantan domba garut dewasa kelamin dengan kondisi tubuh dan kesehatan yang baik, berat badan berkisar antara 70,50 – 97,50 kg atau dengan rata-rata  $83,17 \pm 9,80$  kg dan umur sekitar tiga hingga lima tahun sebagai sumber semen yang diuji kualitasnya. Pejantan dikandangkan secara individu dan diberikan pakan berupa rumput dan leguminosa segar sekitar 7 – 9 kg dan 0,25 kg ampas tahu per ekor per hari. Untuk menjaga kesehatan, pejantan dimandikan setiap pekan.

### Cara Percobaan

Semen ditampung menggunakan vagina buatan satu kali dalam satu pekan. Semen ditampung dua hingga tiga ejakulat setiap ekor domba kemudian dicampur. Segera setelah ditampung, semen dinilai secara makroskopik dan mikroskopik. Penilaian makroskopik meliputi: volume, warna, konsistensi (kekentalan), dan derajat keasaman (pH). Penilaian mikroskopik meliputi: gerakan massa, motilitas, jumlah spermatozoa hidup, konsentrasi, abnormalitas, tudung akrosom utuh (TAU), dan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa.

Semen segar yang memenuhi syarat (motilitas  $\geq 70\%$ , konsentrasi  $\geq 2.000$  juta sel per ml, gerakan massa ++ atau +++, dan abnormalitas  $<15\%$ ) diencerkan sesuai dengan perlakuan yang dicobakan. Pengencer dasar Tris yang digunakan

terdiri atas: 3,32 g Tris (hidroksimetil) amino metana, 1,86 g asam sitrat, 1,37 g fruktosa, 1.000 IU/ml penisilin, dan 1.000 µg/ml streptomisin yang dilarutkan dengan akuabidestilata steril hingga mencapai volume 100 ml. Komposisi pengencer yang digunakan terdiri atas: 75% pengencer dasar Tris, 5% gliserol, 20% kuning telur ayam ras, dan ditambahkan 60 mM laktosa. Pengenceran semen dilakukan dengan satu tahap pada suhu kamar. Perlakuan penambahan β-karoten yang dicobakan adalah: pengencer Tris + 0% (kontrol), 0,001% (Kt0,001), 0,002% (Kt0,002), dan 0,003% (Kt0,003) β-karoten.

β-karoten yang akan ditambahkan ke dalam pengencer terlebih dahulu dilarutkan dengan 0,05 ml etanol, agar dapat larut merata di dalam pengencer. Semen 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 ekuilibrasi, semen dibekukan 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 konteiner nitrogen cair. Setelah satu pekan disimpan, setiap sampel straw masing-masing perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk dinilai kualitasnya. Semen beku dithawing dengan cara memasukkan straw ke dalam air hangat bersuhu 37°C selama 30 detik.

### Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah : motilitas, jumlah spermatozoa hidup, TAU, dan MPU spermatozoa setelah pengenceran, ckuili-brasi, dan *thawing*. Konsentrasi malondialdehida (MDA) setiap perlakuan diukur pada tahap setelah *thawing*.

Motilitas : persentase spermatozoa yang bergerak progresif ke depan. Ditentukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Angka yang diberikan berkisar antara 0 - 100% dengan skala 5% (Toelihere, 1993).

Jumlah spermatozoa hidup : persentase spermatozoa yang hidup. Ditentukan dengan

menggunakan pewarnaan eosin (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah. Sebanyak minimal 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

TAU : persentase spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh. Tudung akrosom utuh ditandai oleh ujung kepala spermatozoa yang berwarna hitam tebal apabila semen dipaparkan di dalam larutan NaCl fisiologis yang mengandung 1% formalin (Saacke dan White, 1972). Sebanyak minimal 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 1000 kali.

MPU : persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh. Ditentukan dengan menggunakan metode osmotic resistance test (Revell dan Mrode, 1994). Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor yang melingkar atau menggembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hiposmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Sebanyak minimal 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Konsentrasi MDA: konsentrasi MDA empat buah sampel semen yang telah dibekukan setiap perlakuan. Dianalisis dengan metode penetapan bilangan asam tiobarbiturat (thiobarbituric acid/TBA) menggunakan spektrofotometer.

### Analisis Data

Data diolah dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan jumlah penampungan semen sebanyak sembilan kali sebagai ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

## Hasil dan Pembahasan

### Karakteristik Semen Segar

Evaluasi terhadap kuantitas dan kualitas semen segar dimaksudkan untuk mengetahui kadar pengenceran yang dibutuhkan serta untuk menentukan apakah semen tersebut layak atau

tidak diproses lebih lanjut. Kuantitas dan kualitas semen yang diperoleh menunjukkan karakteristik semen segar domba garut (Tabel 1).

Hasil penelitian menunjukkan volume semen yang diperoleh rata-rata 1.1 ml, lebih tinggi daripada yang dilaporkan Inounu *et al.*, (2001) bahwa volume semen domba garut rata-rata 0,76 ml (kisaran 0,3 – 2 ml) dan Herdis *et al.* (2002) yakni hanya 0,7 ml. Warna semen krem dan konsistensi kental, sesuai dengan yang dilaporkan Ax *et al.*, (2000), Qomariyah *et al.*, (2001), dan Rizal *et al.* (2002).

Tabel 1. Karakteristik semen segar domba Garut

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	1,1 ± 0,38
Warna	Krem
Derajat keasaman (pH)	7,0 ± 0,11
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi (x 10 <sup>6</sup> /ml)	3.652,00 ± 503,80
Motilitas (%)	78,33 ± 2,46
Spermatozoa hidup (%)	87,50 ± 3,45
Abnormalitas (%)	6,20 ± 1,17
Membran plasma utuh, MPU (%)	87,63 ± 1,57
Tudung akrosom utuh, TAU (%)	87,22 ± 1,55

Sedangkan menurut Inounu *et al.*, (2001) semen segar domba garut memiliki konsistensi encer hingga kental, gerakan massa rata-rata 2,81 (kisaran 1 – 4), motilitas rata-rata 58,08% (kisaran 10 – 80%), spermatozoa hidup rata-rata 54,32% (kisaran 19 – 95%), dan konsentrasi berkisar antara 950 – 4.080 juta spermatozoa /ml (dengan rata-rata 2.490,60 juta spermatozoa/ml).

Hasil penelitian Feradis (1999) pada semen domba st. croix didapatkan volume rata-rata 1.66 ml, pH 6,8, konsentrasi 3.785 juta spermatozoa/ml, motilitas 81,67%, spermatozoa hidup 89,33%, dan abnormalitas 8,33%. Nilai TAU semen segar domba rata-rata 89,90% (Sirman dan Situmorang, 1987) dan rata-rata 94,00% pada domba st croix (Feradis, 1999). Nilai MPU semen segar domba rata-rata 70% (Moses *et al.*, 1997), dan rata-rata 73% (Varcarcel *et al.*, 1997),

Berdasarkan karakteristik semen segar yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa semen segar yang dihasilkan oleh domba-domba percobaan

memiliki kuantitas dan kualitas yang baik, sehingga memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut, baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku.

### Kualitas Spermatozoa Setelah Perlakuan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan  $\beta$ -karoten ke dalam pengencer Tris secara umum meningkatkan semua parameter kualitas semen beku yang diamati. Rata-rata motilitas dan spermatozoa hidup pada tahap setelah thawing perlakuan Kt0,002 (50,55% dan 56,78%) nyata ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan Kt0,001 (46,11% dan 52,89%), Kt0,003 (46,67% dan 5,33%) dan kontrol (46,67% dan 52,33%). Rata-rata TAU pada tahap setelah thawing perlakuan Kt0,002 (51,00%) nyata ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol (47,11%), tetapi tidak nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan Kt0,001 (49,00%) dan Kt0,003 (48,89%). Rata-rata MPU pada tahap setelah thawing perlakuan Kt0,002 (53,78%) nyata ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol (48,44%) dan Kt0,003 (49,67%), tetapi tidak nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan Kt0,001 (50,00%) (Tabel 2).

Pada tahap setelah pengenceran dan ekuilibrisasi, penambahan  $\beta$ -karoten belum memberikan hasil yang nyata lebih baik dibandingkan dengan kontrol (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan  $\beta$ -karoten dengan dosis yang tepat di dalam pengencer Tris memberikan efek yang positif terhadap peningkatan kualitas semen beku domba Garut. Pengaruh positif perlakuan penambahan  $\beta$ -karoten yang nyata hanya setelah tahap thawing diduga disebabkan karena pada saat thawing terjadi peningkatan suhu yang sangat tinggi dan kontak antara oksigen dan spermatozoa, sehingga dapat membentuk senyawa oksigen reaktif seperti radikal hidroksil dan singlet oksigen yang merupakan senyawa radikal bebas berbahaya karena reaktivitasnya sangat tinggi.

Peningkatan suhu yang drastis saat thawing juga mengakibatkan tingginya aktivitas metabolisme yang sekaligus berarti semakin

Tabel 2. Rata-rata motilitas, spermatozoa hidup, TAU, dan MPU semen domba Garut pada beberapa tahap pengolahan semen

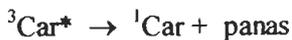
Parameter	Perlakuan	Tahap pengolahan semen		
		Pasca pengenceran	Pasca ekuilibrasi	Pasca thawing
Spermatozoa hidup (%)	Kontrol	76,67 ± 2,36 <sup>a</sup>	70,00 ± 4,08 <sup>a</sup>	46,67 ± 3,33 <sup>a</sup>
	Kt0.001	76,67 ± 2,36 <sup>a</sup>	71,11 ± 3,14 <sup>a</sup>	46,11 ± 2,08 <sup>a</sup>
	Kt0.002	76,67 ± 2,36 <sup>a</sup>	70,55 ± 3,68 <sup>a</sup>	50,55 ± 2,83 <sup>b</sup>
	Kt0.003	76,67 ± 2,36 <sup>a</sup>	69,44 ± 1,57 <sup>a</sup>	46,67 ± 2,36 <sup>a</sup>
TAU (%)	Kontrol	82,11 ± 2,88 <sup>a</sup>	75,22 ± 2,90 <sup>a</sup>	52,33 ± 3,46 <sup>a</sup>
	Kt0.001	83,44 ± 1,71 <sup>a</sup>	76,33 ± 3,68 <sup>a</sup>	52,89 ± 3,14 <sup>a</sup>
	Kt0.002	83,78 ± 1,75 <sup>a</sup>	76,89 ± 2,73 <sup>a</sup>	56,78 ± 3,64 <sup>b</sup>
	Kt0.003	83,33 ± 1,63 <sup>a</sup>	76,11 ± 2,60 <sup>a</sup>	53,33 ± 3,26 <sup>a</sup>
MPU (%)	Kontrol	84,78 ± 1,81 <sup>a</sup>	72,56 ± 2,06 <sup>a</sup>	47,11 ± 3,03 <sup>a</sup>
	Kt0.001	82,22 ± 1,31 <sup>a</sup>	75,00 ± 1,70 <sup>a</sup>	49,00 ± 2,31 <sup>ab</sup>
	Kt0.002	83,00 ± 1,49 <sup>a</sup>	75,55 ± 2,01 <sup>a</sup>	51,00 ± 2,75 <sup>b</sup>
	Kt0.003	82,44 ± 1,42 <sup>a</sup>	73,00 ± 1,56 <sup>a</sup>	48,89 ± 1,45 <sup>ab</sup>

<sup>a b</sup> superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama masing-masing parameter, menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ).

banyak produksi radikal bebas. Sedangkan selama pembekuan berlangsung, membran plasma sel spermatozoa mengalami proses degradasi akibat pengaruh buruk pembekuan, sehingga sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Semua keadaan yang tidak menguntungkan seperti tersebut di atas belum dialami spermatozoa pada tahap pengenceran dan ekuilibrasi. Pada kondisi yang kurang menguntungkan seperti inilah  $\beta$ -karoten memainkan peranan mencegah timbulnya reaksi peroksidasi lipida yang berlebihan pada membran plasma sel spermatozoa yang ditimbulkan oleh radikal bebas dan senyawa oksidan lainnya. Menurut Suryohudoyo (2000) radikal bebas hidroksil dan singlet oksigen dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk 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 seperti enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matriks, dan sitoskeleton. Hasil beberapa

penelitian pada manusia menunjukkan bahwa  $\beta$ -karoten memiliki kemampuan kerja sebagai senyawa antioksidan yang baik. Ini ditunjukkan dengan percobaan terapi  $\beta$ -karoten yang dapat menurunkan kadar lipida peroksida serum, malondialdehid serum, low-density lipoprotein (LDL) yang diinduksi oleh ion Cu, kerusakan DNA, dan pirimidin teroksidasi (Pryor *et al.*, 2000). Menurut Oshima *et al.* (1993)  $\beta$ -karoten memiliki kemampuan memproteksi liposom (suatu vesikel yang memiliki fosfolipida bilayer tunggal) dari kerusakan akibat serangan singlet oksigen.

Singlet oksigen merupakan salah satu jenis senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan dari proses biologis 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 organel-organel sel lainnya (Oshima *et al.*, 1993). Selanjutnya dinyatakan bahwa daya rusak singlet oksigen terhadap sel dapat dicegah oleh  $\beta$ -karoten dengan mekanisme kerja sebagai berikut:



$\beta$ -karoten meredam daya rusak singlet oksigen melalui mekanisme fisikal, dengan cara mentransfer energi dari singlet oksigen ke  $\beta$ -karoten yang memiliki struktur kaya elektron.  $\beta$ -karoten menjadi lebih aktif setelah mendapat tambahan energi dengan berubah bentuk menjadi triplet ( $^3Car^*$ ), setelah itu  $\beta$ -karoten triplet tersebut akan menghilangkan sebagian energinya sebagai panas dan kembali ke bentuk semula ( $^1Car$ ). Karena mekanisme kerjanya berlangsung secara fisikal, maka struktur  $\beta$ -karoten tidak mengalami perubahan setelah bekerja, sehingga masih memiliki kemampuan memproteksi sel dari serangan singlet oksigen berikutnya.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penambahan 0,003%  $\beta$ -karoten memberikan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan penambahan sebanyak 0,002%. Hal ini diduga disebabkan semakin meningkatnya tekanan osmotik pengencer yang berakibat buruk terhadap jalannya proses metabolisme spermatozoa. Proses metabolisme yang terganggu berakibat menurunnya produksi energi berupa ATP, sehingga menurunkan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Sementara pada penambahan sebanyak 0,001%  $\beta$ -karoten belum memberikan perlindungan yang optimal terhadap spermatozoa.

Upaya peningkatan kualitas semen beku dengan menambahkan senyawa antioksidan di dalam pengencer telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Senyawa antioksidan glutation mampu meningkatkan kualitas semen beku sapi (Slaweta dan Laskowska, 1987), semen beku kambing (Sinha *et al.*, 1996), dan semen beku domba garut (Rizal *et al.*, 2004). Peneliti lain menggunakan vitamin C pada semen beku sapi (Beconi *et al.*, 1993) dan semen kelinci (Yousef *et al.*, 2003); vitamin E dan butylated hydroxytoluene (BHT) pada semen beku domba st. croix (Feradis, 1999); serta  $\alpha$ -tokoferol pada semen beku kambing peranakan etawah (Werdhany *et al.*, 2000), semen beku domba garut (Herdis *et al.*, 2002), dan semen kelinci (Yousef *et al.*, 2003).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang positif antara keempat parameter kualitas spermatozoa yang diamati. Ini disebabkan karena  $\beta$ -karoten yang berfungsi sebagai senyawa antioksidan mampu mencegah atau memutus reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel, sehingga mencegah atau mengurangi kerusakan yang terjadi membran plasma sel spermatozoa. Meningkatnya jumlah spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (nilai MPU) menyebabkan proses metabolisme pun dapat berjalan dengan baik, sehingga produksi energi berupa ATP tidak terganggu yang berakibat meningkatnya motilitas dan daya hidup spermatozoa. Membran plasma sel yang utuh juga melindungi vesikel akrosom yang tepat berada di bawah membran plasma sel di bagian ujung kepala spermatozoa dari perusakan secara fisik, sehingga vesikel akrosom tetap utuh dan nilai TAU pun meningkat.

### Malondialdehida (MDA) Semen Beku

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan  $\beta$ -karoten di dalam pengencer Tris nyata menurunkan konsentrasi MDA ( $P < 0,05$ ) dibanding dengan tanpa penambahan  $\beta$ -karoten (Tabel 3). Ini sejalan dengan hasil yang diperoleh pada evaluasi parameter MPU (Tabel 2).

Tabel 3. Kadar MDA semen seku setelah *thawing*

Perlakuan	Ukuran (mg/kg)
Kontrol	5,24 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
Kt <sub>0,001</sub>	3,37 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
Kt <sub>0,002</sub>	3,80 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>
Kt <sub>0,003</sub>	4,61 $\pm$ 0,11 <sup>d</sup>

<sup>abcd</sup>, Superskrip yg berbeda menunjukkan ada perbedaan ( $P < 0,05$ ).

Hal ini menunjukkan bahwa  $\beta$ -karoten efektif mengurangi terjadinya reaksi peroksidasi lipida dan kerusakan membran plasma sel spermatozoa selama proses pengolahan semen, terutama pada tahap pembekuan dan *thawing*, sehingga produksi MDA pun nyata lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol. Menurut Suryohudoyo (2000) serta

Hemachand dan Shaha (2003) malondialdehida (MDA), 9-hidroksi-nonenal (HNE), etana (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>), dan pentana (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>) merupakan senyawa-senyawa aldehida yang bersifat toksik terhadap sel. Senyawa-senyawa ini terbentuk karena terputusnya rantai asam lemak sebagai akibat dari reaksi rantai peroksidasi lipida yang terjadi pada membran plasma sel. Dengan demikian semakin tinggi konsentrasi MDA, HNE, etana, atau pentana di dalam suatu sampel semen menunjukkan bahwa semakin tinggi tingkat kerusakan asam lemak tak jenuh fosfolipida membran plasma sel spermatozoa, yang diakibatkan oleh reaksi rantai peroksidasi lipida.

Konsentrasi MDA menurun jika di dalam medium ditambahkan senyawa antioksidan seperti β-karoten (Pryor *et al.*, 2000), glutation (Suryohudoyo, 2000), serta vitamin E dan BHT (Feradis, 1999). Hal ini disebabkan senyawa-senyawa antioksidan tersebut mampu mencegah dan sekaligus memutus reaksi rantai peroksidasi lipida pada membran plasma sel.

Menurut Hemachand dan Shaha (2003) aktivitas sitotoksik HNE pada spermatozoa dapat dihambat dengan penambahan 1 mM glutation di dalam medium pengencer. Hal yang sama juga dilaporkan Slaweta dan Laskowska (1987) serta Sinha *et al.*, (1996) bahwa terjadi penurunan konsentrasi aspartat amino-transferase (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, yang berarti semakin tinggi konsentrasi enzim-enzim tersebut di dalam semen, menunjukkan semakin banyak spermatozoa yang mengalami kerusakan pada bagian akrosomnya.

Membran vesikel akrosom akan sangat rentan mengalami kerusakan yang berakibat keluarnya enzim-enzim tersebut di atas, apabila membran plasma sel sebagai pelindung bagian paling luar sel spermatozoa mengalami kerusakan.

## Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa penambahan β-karoten ke dalam pengencer Tris secara umum mampu meningkatkan semua parameter kualitas semen beku domba garut yang diamati. Penambahan sebanyak 0,002% β-karoten di dalam pengencer Tris merupakan dosis yang paling optimal dalam meningkatkan kualitas semen beku domba garut. β-karoten nyata menurunkan konsentrasi MDA semen beku dibandingkan dengan kontrol.

## 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 pendukung lainnya sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

## Daftar Pustaka

- Ax, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2000. Semen evaluation. In: *Reproduction in Farm Animals 7<sup>th</sup> ed.*, E.S.E. Hafez and B. Hafez (eds). Lippincott Williams, Baltimore, USA. Pp. 365-375.
- Beconi, M.T., C.R. Francia, N.G. Mora, and M.A. Afranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40:841-851.
- 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.
- Hemachand, T. and C. Shaha. 2003. Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS Letters* 26999:1-5.
- Herdis, I. Kusuma, M. Surachman, M. Rizal, I.K. Utama, I. Inounu, B. Purwantara, dan I. Arifiantini. 2002. Peningkatan kualitas semen beku domba Garut melalui penambahan α-

- tokoferol ke dalam pengencer susu skim kuning telur. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 7:12-17.
- Inounu, L, N. Hidajati, S.N. Jarmani, D. Priyanto, Hastono, B. Setiadi, dan Subandriyo. 2001. Pengaruh interaksi genetik dan lingkungan terhadap produksi domba persilangan dan domba lokal pada beberapa lokasi pengamatan: evaluasi kualitas semen domba hasil persilangan. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II"*. Puslitbang Peternakan. Hlm 64-73.
- Moses, D.F., A. Varcарcel, L.J. Perez, and M.A. de Las Heras. 1997. Intracellular ATP concentration are maintained in freezing-resistant ram spermatozoa. *Cryo Letters* 17:287-294.
- Oshima, S., F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro, and J. Terao. 1993. Inhibitory effect of  $\beta$ -carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nur. Sci. Vitaminol* 39:607-615.
- Pryor, W.A., W. Stahl, and C.L. Roch. 2000.  $\beta$ -carotene: from biochemistry to clinical trials. *Nutr. Rev.* 58:39-53.
- Qomariyah S. Mihardja, dan R. Igi. 2001. Pengaruh kombinasi kuning telur dengan air kelapa terhadap daya tahan hidup dan abnormalitas spermatozoa domba Priangan pada penyimpanan 5°C. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Balitbang Pertanian, Departemen Pertanian. Bogor, 17-18 September 2001.* Hlm 172-177.
- Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara, dan P. Situmorang. 2002. Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 7:194-199.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara, dan P. Situmorang. 2004. Efektivitas berbagai konsentrasi glutathione terhadap kualitas semen yang telah dibekukan pada domba garut. *Jurnal Biosains*. Submitted.
- Saacke, R.G. and J.M. White. 1972. Semen quality test and their relationship to fertility. *Proceeding 4<sup>th</sup> Tech. Conf. On AI and Reprod., NAAB.* Pp 22-27.
- 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.
- Sirman, P. dan P. Situmorang. 1987. Evaluasi semen domba hair. *Jurnal Ilmu dan Peternakan* 3:1-3.
- 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.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Suryohudoyo, P. 2000. Oksidan, antioksidan, dan radikal bebas. Suryohudoyo P dalam: Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler. CV Sagung Seto, Jakarta. Hlm 31-47.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Varcарcel, A., M.A. de Las Heras, L. Perez, D.F. Moses, and H. Baldassare. 1997. Assesment of the acrosomal status of membrane intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/hoechst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.* 45:229-309.
- Werdhany, I.W., M.R. Toelihere, I. Supriatna, dan I.K. Utama. 2000. Efek pemberian berbagai konsentrasi  $\alpha$ -tokoferol sebagai antioksidan dalam pengencer Tris sitrat terhadap motilitas sperma kambing peranakan Etawah. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan. Bogor, 18-19 Oktober 1999.* 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