

## Peranan Beberapa Jenis Gula dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Domba Garut

MUHAMMAD RIZAL<sup>1</sup>, HERDIS<sup>2</sup>, ARIEF BOEDIONO<sup>3</sup>, ACHMAD SELAMET AKU<sup>4</sup> dan YULNAWATI<sup>5</sup>

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

E-mail: icang65@yahoo.com

<sup>2</sup>Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung II BPPT, Jl. MH. Thamrin 8 Jakarta 10340

<sup>3</sup>Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Darmaga 16680

<sup>4</sup>Program Studi Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

<sup>5</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Cibinong 16911

(Diterima dewan redaksi 27 Februari 2006)

### ABSTRACT

RIZAL, M., HERDIS, A. BOEDIONO, A.S. AKU and YULNAWATI. 2006. Role of various sugars in improving frozen semen quality of Garut ram. *JITV* 11(2): 123-130.

Ram spermatozoa are sensitive to extreme changes in temperature during the freeze-thawed process. The present study was conducted to examine the effects of addition of various sugars in Tris extender on sperm cryosurvival of Garut ram. Semen was collected using an artificial vagina from three mature rams once a week. Immediately after initial evaluation, semen was divided into five parts and diluted with Tris extender (control), Tris extender + 0.4% dextrose, Tris extender + 0.4% raffinose, Tris extender + 0.4% trehalose, and Tris extender + 0.4% sucrose, respectively. Semen was loaded in to 0.25 ml mini straw with the concentration of 200 million or 800 million motile spermatozoa per ml. Semen was equilibrated at 5°C for three hours, then frozen and stored in liquid nitrogen for seven days. Quality of processed-semen including percentages of motile spermatozoa (MS), live spermatozoa (LS), intact acrosome cap (IAC), and intact plasma membrane (IPM) were evaluated after dilution, equilibration, and thawing, respectively. Data were analyzed using completely randomized design with five treatments and six replicates. Means were compared significant difference test at 0.05 significant level. Results of this research showed that there was no significantly difference ( $P>0.05$ ) between treatments for all sperm quality parameters after dilution and equilibration. Mean percentages of post thawing MS, LS, IAC, and IPM for dextrose (54.00; 68.00; 66.60, and 57.83%), raffinose (50.00; 64.33; 61.80, and 61.75%), trehalose (50.83; 65.67; 61.40 and 57.75%), and sucrose (49.00; 66.80; 58.50 and 58.50%) were significantly ( $P<0.05$ ) higher than control (40.83; 52.67; 54.60, and 49.40%) respectively. In conclusion, addition of 0.4% dextrose, raffinose, trehalose or sucrose in Tris extender are effective in improving frozen semen quality of Garut ram.

**Key Words:** Sugars, Tris extender, Frozen Semen Quality, Garut Ram

### ABSTRAK

RIZAL, M., HERDIS, A. BOEDIONO, A.S. AKU dan YULNAWATI. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *JITV* 11(2): 123-130.

Spermatozoa domba sangat sensitif terhadap perubahan suhu yang ekstrim selama proses pembekuan dan *thawing* semen beku. Penelitian ini dilakukan untuk menguji pengaruh penambahan beberapa jenis gula di dalam pengencer Tris terhadap daya hidup spermatozoa domba Garut setelah dibekukan. Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dari tiga ekor domba Garut jantan dewasa kelamin, satu kali dalam satu minggu. Segera setelah dievaluasi, semen segar dibagi ke dalam lima buah tabung reaksi yang masing-masing telah diisi dengan pengencer perlakuan, yakni pengencer Tris (kontrol), pengencer Tris + 0,4% dextrosa, pengencer Tris + rafinosa 0,4%, pengencer Tris + trehalosa 0,4%, dan pengencer Tris + sukrosa 0,4%. Semen dikemas di dalam *straw* mini dengan konsentrasi 200 juta spermatozoa motil per 0,25 ml atau 800 juta spermatozoa motil per ml. Semen diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama tiga jam, kemudian dibekukan dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair selama tujuh hari. Kualitas semen meliputi persentase spermatozoa motil (SM), spermatozoa hidup (SH), tudung akrosom utuh (TAU), dan membran plasma utuh (MPU) dievaluasi masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*. Data dianalisis dengan rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan enam kali ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antar perlakuan terhadap semua peubah kualitas spermatozoa pada tahap setelah pengenceran dan ekuilibrasikan. Pada tahap setelah *thawing*, rata-rata persentase SM, SH, TAU, dan MPU perlakuan dextrosa (54,00; 68,00; 66,60, dan 57,83%), rafinosa (50,00; 64,33; 61,80 dan 61,75%), trehalosa (50,83, 65,67, 61,40, dan 57,75%), dan sukrosa (49,00; 66,80; 58,50, dan 58,50%) nyata ( $P<0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (40,83, 52,67; 54,60, dan 49,40%). Dapat disimpulkan bahwa penambahan dextrosa, rafinosa, trehalosa, atau sukrosa 0,4% di dalam pengencer Tris efektif meningkatkan kualitas semen beku domba Garut.

**Kata Kunci:** Gula, Pengencer Tris, Kualitas Semen Beku, Domba Garut

## PENDAHULUAN

Domba Garut merupakan salah satu domba tropik yang prolifrik serta mempunyai bobot hidup yang lebih berat dibandingkan dengan domba lokal Indonesia lainnya. Bobot hidup pejantan domba Garut dewasa rata-rata 60–80 kg, bahkan dapat mencapai lebih dari 100 kg. Dengan demikian, semen pejantan domba garut dapat digunakan untuk memperbaiki performans domba-domba lokal yang lain melalui teknologi inseminasi buatan (IB). Hingga saat ini keberhasilan program IB yang menggunakan semen beku pada ternak domba belum sesuai dengan yang diharapkan. Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya angka kebuntingan adalah kurang baiknya kualitas semen beku yang digunakan. Hal ini karena dalam proses pembuatan semen beku terdapat beberapa perlakuan yang sebenarnya tidak menguntungkan bagi upaya mempertahankan kualitas spermatozoa.

Dalam proses pembekuan semen, akibat perlakuan suhu yang sangat rendah ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) akan terbentuk kristal-kristal es dan perubahan konsentrasi elektrolit yang akan menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel spermatozoa. Untuk mengurangi efek tersebut, di dalam pengencer harus ditambahkan senyawa krioprotektan. Jenis krioprotektan yang baik dan sudah sangat lazim digunakan dalam proses pembekuan (kriopreservasi) semen adalah gliserol. Selain gliserol sebagai krioprotektan intraseluler, dikenal pula berbagai macam gula baik monosakarida maupun disakarida dan polisakarida yang dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Perpaduan antara kedua jenis krioprotektan ini diharapkan dapat memberikan perlindungan yang lebih optimal terhadap spermatozoa selama proses pembekuan semen.

Spermatozoa domba sangat sensitif terhadap perubahan suhu yang ekstrim selama proses pembekuan dan *thawing* semen beku (SALAMON dan MAXWELL, 1995a, 1995b, 2000) sehingga menurunkan persentase spermatozoa motil (FISER dan FAIRFULL, 1984, 1986; PONTBRIAND *et al.*, 1989; EDWARD *et al.*, 1995; BAG *et al.*, 2002) dan integritas membran plasma sel (FISER dan FAIRFULL, 1989; MAXWELL *et al.*, 1995). Dengan demikian, perlu ditambahkan senyawa tertentu di dalam pengencer semen untuk mengurangi dampak negatif tersebut.

Upaya memperbaiki kualitas semen beku domba dengan menambahkan berbagai jenis gula di dalam pengencer telah banyak dilaporkan. Beberapa jenis gula yang ditambahkan di dalam pengencer berhasil memperbaiki kualitas semen beku domba, seperti glukosa (MOLINIA *et al.*, 1993), trehalosa dan EDTA pada domba Pampinta (AISEN *et al.*, 2000; 2002), serta laktosa (RIZAL *et al.*, 2003) dan maltosa (HERDIS, 2005) pada domba Garut.

Peningkatan keberhasilan IB menggunakan semen beku mungkin dapat juga ditempuh dengan menambah konsentrasi spermatozoa motil yang diinseminasikan. FERADIS (1999) melaporkan angka kebuntingan sebesar 60% pada domba *St. Croix*. Angka kebuntingan dan kelahiran sebesar 58,33% (RIZAL, 2005) dan 57% (HERDIS, 2005) pada domba Garut yang diinseminasi dengan semen beku berkonsentrasi 800 juta spermatozoa motil per ml (perhitungan sebelum semen dibekukan).

Pada penelitian ini dicoba menambahkan berbagai jenis gula yakni dextrosa, rafinosa, trehalosa, dan sukrosa di dalam pengencer Tris pada proses kriopreservasi semen domba Garut. Penggunaan beberapa jenis gula tersebut belum pernah dilaporkan pada proses preservasi dan kriopreservasi semen domba Garut. Diharapkan dengan penambahan beberapa jenis gula tersebut dapat memperbaiki kualitas semen beku domba Garut dan sekaligus memberikan banyak pilihan penggunaan gula dalam proses kriopreservasi semen domba, khususnya domba Garut.

## MATERI DAN METODE

### Hewan percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah tiga ekor domba Garut jantan dewasa kelamin berumur sekitar tiga tahun dan bobot hidup 70–98 kg dengan kondisi tubuh dan kesehatan baik, sebagai sumber semen yang diuji kualitasnya. Setiap domba dikandangkan secara individu dan diberikan pakan berupa rumput dan leguminosa segar sebanyak 7–9 kg dan ampas tahu atau tempe sebanyak 250 g ekor<sup>-1</sup> hari<sup>-1</sup>. Untuk menjaga kesehatan, domba-domba tersebut dimandikan setiap minggu.

### Cara percobaan

Semen ditampung menggunakan vagina buatan satu kali dalam satu minggu. Segera setelah ditampung, semen dinilai secara makroskopik dan mikroskopik. Penilaian makroskopik meliputi: volume, warna, konsistensi (kekentalan), dan derajat keasaman (pH) semen. Penilaian mikroskopik meliputi: gerakan massa, persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa abnormal, persentase tudung akrosom utuh (TAU), dan persentase membran plasma utuh (MPU). Semen segar yang memenuhi syarat, yakni yang memiliki persentase spermatozoa motil  $\geq 70\%$ , konsentrasi spermatozoa  $\geq 2000$  juta sel per ml, gerakan massa ++ atau +++, dan persentase spermatozoa abnormal  $< 15\%$  (RIZAL *et al.*, 2002) diencerkan sesuai dengan perlakuan yang dicobakan (Tabel 1).

Semen yang telah diencerkan dikemas di dalam *straw* mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 200 juta spermatozoa motil per *straw* atau 800 juta spermatozoa motil per ml, kemudian diekuilibrasikan di dalam lemari es pada suhu 5°C selama tiga jam. Pembekuan semen diawali dengan meletakkan *straw* yang telah diekuilibrasikan 10 cm di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -130°C) selama 15 menit. Kemudian *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu sekitar -196°C) dan disimpan di dalam kontainer. Setelah disimpan selama tujuh hari, sampel semen beku masing-masing perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. *Thawing* dilakukan dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik.

### Peubah yang Diamati

Peubah kualitas semen yang diamati adalah persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, persentase TAU, dan persentase MPU masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasikan, dan *thawing*.

Persentase spermatozoa yang progresif (bergerak ke depan) dihitung secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya

pembesaran 400x. Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah dengan menggunakan pewarna 2% eosin B (TOELIHERE, 1993). Tudung akrosom utuh ditandai oleh ujung kepala spermatozoa yang berwarna hitam tebal apabila semen dipaparkan di dalam larutan NaCl fisiologis yang mengandung 1% formaldehida (SAACKE dan WHITE, 1972). Membran plasma utuh ditandai oleh ekor spermatozoa yang melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hiposmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit (REVELL dan MRODE, 1994). Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x untuk masing-masing peubah yang dievaluasi.

### Analisis Data

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan jumlah penampungan semen sebanyak enam kali sebagai ulangan. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (STEEL dan TORRIE, 1993).

**Tabel 1.** Komposisi pengencer perlakuan

Unsur	Perlakuan				
	Kontrol	Dextrosa	Rafinosa	Trehalosa	Sukrosa
Tris(hidroksimetil)aminometan (g)	2,42	2,42	2,42	2,42	2,42
Asam sitrat-monohidrat (g)	1,28	1,28	1,28	1,28	1,28
D(-)Fruktosa (g)	2,16	2,16	2,16	2,16	2,16
Dextrosa (g)	-	0,4	-	-	-
Rafinosa (g)	-	-	0,4	-	-
Trehalosa (g)	-	-	-	0,4	-
Sukrosa (g)	-	-	-	-	0,4
Penisilin-G (µg/ml)	1000	1000	1000	1000	1000
Streptomisin (µg/ml)	1000	1000	1000	1000	1000
Gliserol (ml, v/v)	5	5	5	5	5
Kuning telur ayam ras (ml, v/v)	20	20	20	20	20
Akuabidestilata <i>ad</i> (ml)	100	100	100	100	100

## 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 2).

**Tabel 2.** Karakteristik semen segar domba Garut

Peubah	Rata-rata
Volume (ml)	0,82 ± 0,16
Warna	Krem
Derajat keasaman (pH)	6,89 ± 0,11
Konsistensi (kekentalan)	Kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi spermatozoa ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	4368 ± 303
Persentase spermatozoa motil (%)	74,17 ± 2,24
Persentase spermatozoa hidup (%)	86,60 ± 2,30
Persentase spermatozoa abnormal (%)	2,67 ± 1,15
Persentase tudung akrosom utuh (%)	85,00 ± 2,00
Persentase membran plasma utuh (%)	85,00 ± 1,00

Hasil penelitian ini kurang lebih sama dengan yang dilaporkan peneliti sebelumnya, yakni volume semen domba Garut rata-rata 0,84 ml (YULNAWATI, 2002), 0,86 ml (FARHAN, 2003), dan 0,97 ml (KRISTANTO, 2004). Selanjutnya dilaporkan pula bahwa persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU semen domba Garut masing-masing 74,7; 83,00 dan 85,50% (YULNAWATI, 2002), 78,64; 83,18 dan 81,00% (FARHAN, 2003), serta 75,00; 84,80 dan 81,20% (KRISTANTO, 2004). RIZAL *et al.* (2003) melaporkan bahwa persentase spermatozoa motil, TAU, dan MPU semen segar domba Garut adalah masing-masing rata-rata 76,67; 84,50 dan 87,33%. Sementara itu, menurut INOUNU *et al.* (2001) volume semen domba Garut rata-rata 0,76 ml (kisaran 0,3–2 ml), warna bening hingga krem, konsistensi encer hingga kental, gerakan massa rata-rata 2,81 (kisaran 1–4), persentase spermatozoa motil rata-rata 58,08% (kisaran 10–80%), persentase spermatozoa hidup rata-rata 64,32% (kisaran 19–95%), dan konsentrasi spermatozoa rata-rata 2490,60 juta sel/ml (kisaran 950–4080 juta sel/ml).

Berdasarkan nilai karakteristik semen yang diperoleh, dapat dikatakan bahwa semen segar domba percobaan memiliki kualitas yang baik sehingga layak

diproses lebih lanjut, baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku.

### Kualitas spermatozoa setelah proses pengolahan semen

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan gula berupa 0,4% dextrosa atau 0,4% rafinosa atau 0,4% trehalosa atau 0,4% sukrosa di dalam pengencer Tris mampu meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan gula memperlihatkan pengaruh yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, TAU, dan MPU pada tahap setelah pengenceran dan ekuilibrasi (Tabel 3).

Pada tahap setelah *thawing*, rata-rata persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, TAU dan MPU perlakuan dextrosa (54,00; 68,00; 66,60 dan 57,83%), rafinosa (50,00; 64,33; 61,80 dan 61,75%), trehalosa (50,83; 65,67; 61,40 dan 57,75%), dan sukrosa (49,00; 66,80; 58,50, dan 58,50%) berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan perlakuan kontrol (40,83; 52,67; 54,60 dan 49,40%) (Tabel 3).

Hasil penelitian yang menunjukkan adanya perbaikan kualitas semen beku dengan penambahan berbagai jenis gula di dalam pengencer menjadi indikator bahwa gula-gula tersebut efektif melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses kriopreservasi semen. Dalam hal ini gula yang ditambahkan berfungsi sebagai substrat sumber energi dan sekaligus sebagai krioprotektan ekstraseluler. Sebagai substrat sumber energi, gula tersebut akan dimetabolisir melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam trikarboksilat (siklus Krebs), sehingga dihasilkan energi berupa ATP yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam pergerakan (motilitas). Sebagai krioprotektan ekstraseluler, gula akan melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan secara mekanik yang terjadi saat proses kriopreservasi semen. Hal ini ditandai dengan lebih tingginya nilai persentase MPU semen beku perlakuan penambahan gula dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Tabel 3). Menurut SALAMON dan MAXWELL (2000) gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (*glass*) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel spermatozoa secara mekanik.

Apabila membran plasma sel dapat dilindungi dari kerusakan selama proses pengolahan semen, akan berpengaruh positif terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hal ini karena motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan berlangsung dengan baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan

**Tabel 3.** Pengaruh perlakuan penambahan beberapa jenis gula terhadap rata-rata persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, TAU, dan MPU semen domba Garut

Peubah	Tahap pengolahan	Perlakuan				
		Kontrol	Dextrosa	Rafinosa	Trehalosa	Sukrosa
Spermatozoa motil (%)	Pengenceran	74,17 ± 2,04 <sup>a</sup>	74,17 ± 2,04 <sup>a</sup>	74,17 ± 2,04 <sup>a</sup>	74,17 ± 2,04 <sup>a</sup>	74,17 ± 2,04 <sup>a</sup>
	Ekuilibrasi	65,83 ± 4,92 <sup>a</sup>	66,67 ± 5,16 <sup>a</sup>	68,33 ± 4,08 <sup>a</sup>	66,67 ± 5,16 <sup>a</sup>	67,50 ± 5,24 <sup>a</sup>
	<i>Thawing</i>	40,83 ± 3,76 <sup>a</sup>	54,00 ± 6,32 <sup>b</sup>	50,00 ± 4,47 <sup>b</sup>	50,83 ± 4,92 <sup>b</sup>	49,00 ± 5,48 <sup>b</sup>
Spermatozoa hidup (%)	Pengenceran	80,83 ± 1,94 <sup>a</sup>	81,17 ± 2,14 <sup>a</sup>	81,83 ± 2,23 <sup>a</sup>	81,00 ± 1,41 <sup>a</sup>	81,67 ± 2,80 <sup>a</sup>
	Ekuilibrasi	76,67 ± 2,80 <sup>a</sup>	75,50 ± 3,27 <sup>a</sup>	77,17 ± 2,64 <sup>a</sup>	76,17 ± 2,56 <sup>a</sup>	76,83 ± 3,31 <sup>a</sup>
	<i>Thawing</i>	52,67 ± 1,51 <sup>a</sup>	68,00 ± 5,29 <sup>b</sup>	64,33 ± 5,20 <sup>b</sup>	65,67 ± 3,44 <sup>b</sup>	66,80 ± 5,81 <sup>b</sup>
TAU (%)	Pengenceran	80,50 ± 1,76 <sup>a</sup>	81,83 ± 1,94 <sup>a</sup>	81,00 ± 1,55 <sup>a</sup>	81,50 ± 1,76 <sup>a</sup>	81,17 ± 1,72 <sup>a</sup>
	Ekuilibrasi	76,67 ± 4,08 <sup>a</sup>	77,50 ± 2,26 <sup>a</sup>	78,50 ± 2,66 <sup>a</sup>	77,33 ± 2,16 <sup>a</sup>	77,33 ± 2,88 <sup>a</sup>
	<i>Thawing</i>	54,60 ± 3,29 <sup>a</sup>	66,60 ± 5,03 <sup>c</sup>	61,80 ± 4,32 <sup>bc</sup>	61,40 ± 4,93 <sup>bc</sup>	58,50 ± 4,81 <sup>ab</sup>
MPU (%)	Pengenceran	81,67 ± 2,16 <sup>a</sup>	80,50 ± 0,84 <sup>a</sup>	81,83 ± 1,60 <sup>a</sup>	80,17 ± 1,60 <sup>a</sup>	81,83 ± 2,56 <sup>a</sup>
	Ekuilibrasi	76,67 ± 2,42 <sup>a</sup>	77,67 ± 0,82 <sup>a</sup>	78,17 ± 1,47 <sup>a</sup>	77,67 ± 1,63 <sup>a</sup>	77,83 ± 1,94 <sup>a</sup>
	<i>Thawing</i>	49,40 ± 2,19 <sup>a</sup>	57,83 ± 6,62 <sup>b</sup>	61,75 ± 5,32 <sup>b</sup>	57,75 ± 3,77 <sup>b</sup>	58,50 ± 4,97 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Superskrip dalam baris yang sama, menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0,05$ )

elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. SUBOWO (1995) melaporkan di dalam membran plasma sel terdapat banyak makromolekul seperti protein, lipoprotein, glikoprotein dan lain-lain yang dapat berfungsi sebagai enzim, reseptor, saluran, atau pembawa (*carrier*). Makromolekul-makromolekul tersebut memfasilitasi lalu lintas masuk dan keluar dari sel seluruh substrat dan elektrolit tersebut. Substrat dan elektrolit harus difasilitasi karena mereka tidak dapat menembus secara difusi bebas membran plasma sel spermatozoa yang bersifat semipermeabel. Selain itu, membran plasma sel juga berfungsi melindungi organel-organel yang terdapat di dalam sel dari perusakan secara mekanik, termasuk vesikel akrosom yang berada tepat di bawah membran plasma sel di daerah ujung kepala spermatozoa.

Gula dapat melindungi membran plasma sel spermatozoa karena pada bagian luar membran plasma sel terdapat karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid) atau protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks (SUBOWO, 1995). Diasumsikan bahwa gula yang ditambahkan di dalam pengencer akan berasosiasi dengan karbohidrat tersebut sehingga terlindungi dari kerusakan secara mekanik selama proses kriopreservasi. Kalaupun karbohidrat yang ada pada membran plasma sel spermatozoa tersebut rusak selama proses kriopreservasi, diharapkan gula yang ditambahkan di dalam pengencer dapat menjadi pengganti sehingga struktur selubung sel tetap utuh.

Gula dapat menjadikan membran plasma sel spermatozoa lebih stabil selama proses kriopreservasi, seperti yang dilaporkan pada berbagai jenis sel lain yang telah dibekukan (STRAUSES *et al.*, 1986; ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; BAKAS dan DISALVO, 1991). Gula juga memegang peranan penting dalam menurunkan kandungan garam larutan pengencer, sehingga dapat mengurangi efek solusi (*solution effect*) (SUPRIATNA dan PASARIBU, 1992). Ini menyebabkan gula dapat mencegah perusakan terhadap sel akibat meningkatnya kadar garam selama proses pembekuan (NICOLLAJSEN dan HVIDT, 1994).

Menurut CROWE *et al.* (1984), WOELDERS *et al.* (1997), VISWANATH dan SHANON (2000), dan AISEN *et al.* (2002) efek krioprotektif gula dihasilkan dari terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus hidroksil gula dan bagian kepala polar fosfolipid membran plasma sel spermatozoa, sehingga gula menggantikan posisi molekul air selama proses dehidrasi berlangsung saat pembekuan. Dengan demikian, gula dapat mengatur fluiditas membran plasma sel spermatozoa. Menurut GIRAUD *et al.* (2000) motilitas dan daya hidup spermatozoa setelah *thawing* dapat ditingkatkan jika fluiditas membran plasma sel tinggi sebelum pembekuan.

Pengaruh positif perlakuan penambahan gula yang hanya nyata pada tahap setelah *thawing* diduga karena pada saat pembekuan dan *thawing*, terjadi tekanan yang berat terhadap sel spermatozoa akibat penurunan suhu yang drastis saat pembekuan, dan peningkatan suhu

yang juga drastis saat *thawing*. Dalam keadaan seperti ini, gula akan memberikan perlindungan yang optimal terhadap integritas membran plasma sel dan sel spermatozoa secara keseluruhan. Pada tahap pengenceran dan ekuilibrisasi, spermatozoa belum mendapatkan tekanan berat seperti pada saat pembekuan dan *thawing*. Hal ini menjadi petunjuk bahwa dalam proses kriopreservasi semen, gula yang ditambahkan di dalam pengencer semen, lebih berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler daripada sebagai substrat sumber energi. Gula dari golongan disakarida dan polisakarida dapat digunakan sebagai substrat sumber energi oleh spermatozoa, hanya jika di dalam plasma semen atau pengencer tersedia enzim yang mengurainya menjadi beberapa unit monosakarida.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini mendukung hasil penelitian pada berbagai jenis hewan dan ternak. MOLINIA *et al.* (1993) melaporkan persentase spermatozoa motil semen beku domba sebesar 46,20% dengan penambahan 210 mM glukosa di dalam pengencer Tris. DE LOS REYES (2000) memperoleh persentase spermatozoa motil semen beku babi sebesar 58% dengan penambahan 184,96 mM glukosa di dalam pengencer Tris. Kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah meningkat dengan menambahkan 9% rafinosa di dalam pengencer Tris (SUWARSO, 1999). AISEN *et al.* (2000, 2002) melaporkan persentase spermatozoa motil semen beku domba Pampinta sebesar 64% untuk semen yang diencerkan dengan pengencer Tris yang ditambahkan trehalosa serta 52,10% untuk yang ditambahkan EDTA. Hal sama juga dilaporkan bahwa penambahan gula berupa sukrosa dan trehalosa di dalam pengencer nyata meningkatkan persentase spermatozoa motil semen beku sapi (WOELDERS *et al.*, 1997), rafinosa dan trehalosa pada semen beku mencit (STOREY *et al.*, 1998), serta trehalosa pada semen beku anjing (YILDIZ *et al.*, 2000) dan pada semen beku kambing (EIMAN *et al.*, 2003). Penambahan gula berupa 60 mM laktosa (RIZAL *et al.*, 2003) dan 1,2% maltosa (HERDIS, 2005) di dalam pengencer Tris nyata meningkatkan kualitas semen beku domba Garut.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa seluruh domba yang diuji menghasilkan semen segar dengan kuantitas dan kualitas yang baik, sehingga layak diolah menjadi semen cair atau semen beku untuk keperluan IB. Penambahan 0,4% dextrosa atau 0,4% rafinosa, atau 0,4% trehalosa, atau 0,4% sukrosa di dalam pengencer Tris efektif meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Untuk mengetahui apakah peningkatan kualitas semen beku akibat penambahan gula di dalam pengencer juga diikuti oleh meningkatnya

angka kebuntingan secara signifikan, perlu dilakukan uji fertilitas.

### UCAPAN TERIMA KASIH

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

### DAFTAR PUSTAKA

- AISEN, E.G., H.L. ALVAREZ, A. VENTURINO and J.J. GARDE. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- AISEN, E.G., V.H. MEDINA and A. VENTURINO. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- ANCHORDOGUY, T.J., A.S. RUDOLPH, J.F. CARPENTER and J.H. CROWE. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331.
- BAG, S., A. JOSHI, P.S. RAWAT and J.P. MITTAL. 2002. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Rumin. Res.* 43: 23-29.
- BAKAS, L.S. and E.A. DISALVO. 1991. Effects of Ca<sup>2+</sup> on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 28: 347-353.
- CROWE, L.M., R. MOURADIAN, J.H. CROWE, S.A. JACKSON and C. WOMERSLEY. 1984. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochem. Biophys. Acta* 779: 141-150.
- DE LOS REYES, M., L. SAENZ, L. LAPIERE, J. CROSBY and C. BARROS. 2000. *In vitro* evaluation of boar spermatozoa frozen with permeable and non permeable cryoprotectant. Proc. 14<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. Stockholm, 2-6 July 2000. Abstract Vol.2. p. 161.
- EDWARD, A.Y., D.P. WINDSOR, I.W. PURVIS, L.G. SANCHEZ-PARTIDA and W.M.C. MAXWELL. 1995. Distribution of variance associated with measurement of post-thaw function in ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 129-134.
- EIMAN, M, E. ABOAGLA and T. TERADA. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69: 1675-1682.
- FARHAN. 2003. Kajian Nira Sebagai Pengencer Alternatif Semen Domba Garut. Skripsi. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- 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.
- FISER, P.S. and R.W. FAIRFULL. 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa in straws. *Cryobiology* 21: 542-551.
- FISER, P.S. and R.W. FAIRFULL. 1986. The effect of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23:518-524.
- FISER, P.S. and R.W. FAIRFULL. 1989. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 64-69.
- GIRAUD, M.N., C. MOTTE, D. BOUCHER and G. GRIZARD. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15: 2160-2164.
- HERDIS. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- INOUNU, I., 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. Pros. Seminar Hasil Penelitian Bagian Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II. Puslitbang Peternakan. Bogor. hlm. 64-73.
- KRISTANTO, T. 2004. Peranan Gliserol dan *Fetal Bovine Serum* dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- MAXWELL, W.M.C., S.J. ROBINSON, P.C. MOLINIA, L.G. SANCHEZ-PARTIDA and G. EVANS. 1995. Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenosine and kallikrein. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 1081-1087.
- MOLINIA, F.C., G. EVANS, P.I. QUINTANA-CASARES and W.M.C. MAXWELL. 1993. Effect of monosaccharides and disaccharides in tris based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 113-122.
- NICOLLAJSEN, H. and A. HVIDT. 1994. Phase behaviour of the system trehalose-NaCl-water. *Cryobiology* 31:199-205.
- PONTBRIAND, D., J.G. HOWARD, M.C. MAXIMUM, L.D. STUART and D.E. WILDT. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 341-354.
- REVELL, S.G. and R.A. MRODE. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- RIZAL, M. 2005. Fertilitas Spermatozoa Ejakulat dan Epididimis Domba Garut Hasil Kriopreservasi Menggunakan Modifikasi Pengencer Tris dengan Berbagai Krioprotektan dan Antioksidan. Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- RIZAL, M., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan P. SITUMORANG. 2002. Kualitas semen beku domba Garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *JITV* 7: 194-199.
- RIZAL, M., M.R. TOELIHERE, T.L. YUSUF, B. PURWANTARA dan P. SITUMORANG. 2003. Kriopreservasi semen domba Garut dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan* 19: 79-83.
- SAACKE, R.G. and J.M. WHITE. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. Proc. 4<sup>th</sup> Tech. Conf. on AI and Reproduction, NAAB. pp. 22-27.
- SALAMON, S. and W.M.C. MAXWELL. 1995a. Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- SALAMON, S. and W.M.C. MAXWELL. 1995b. Frozen storage of ram semen. 2. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38: 1-36.
- SALAMON, S. and W.M.C. MAXWELL. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.
- STEEL, R.G.D. dan J.H. TORRIE. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Terjemahan B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- STOREY, B.T., E.E. NOILES and K.A. THOMPSON. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37: 46-58.
- STRAUSES, G., P. SCHURTENBERGER and H. HUSER. 1986. The interaction of saccharides with lipid bilayer vesicles: Stabilization during freeze-thawing and freeze-drying. *Biochem. Biophys. Acta* 858: 169-180.
- SUBOWO. 1995. Biologi Sel. Angkasa, Bandung.
- SUPRIATNA, I. dan F.H. PASARIBU. 1992. *In Vitro* Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- SUWARSO. 1999. Peranan Rafinosa dalam Pengencer Tris-Sitrat-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. Tesis. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- TOELIHERE, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa. Bandung.

- VISWANATH, R. and P. SHANNON. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 23-53.
- WOELDERS, H., A. MATTHIJ and B. ENGEL. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93-105.
- YILDIZ, C., A. KAYA, M. AKSOY and T. TEKELI. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.
- YULNAWATI. 2002. Pemanfaatan Sari Buah Melon dan Sari Wortel Sebagai Pengencer Alternatif Semen Domba Garut. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.