

Daya Tahan Spermatozoa terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi Pejantan Unggul

Sukmawati E¹, Arifiantini RI², Purwantara B³

¹*Pascasarjana Biologi Reproduksi, Institut Pertanian Bogor*

^{2,3}*Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor*
E-mail: ros.sukmawati@gmail.com

(Diterima 18 Juni 2014 ; disetujui 28 Agustus 2014)

ABSTRACT

Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. 2014. Freezing capacity of sperm on various type of superior bulls. JITV 19(3): 168-175. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i3.1079>

Low quality of sperm after freezing and thawing process due to changes in extreme temperature and osmolarity. The sperm freezing capability and sperm membrane damage was to evaluate by measuring the levels of malondialdehyde (MDA) of Simmental, Limousin and Friesian Holstein (FH) bull of a total of 10 bulls aged 4-8 years. Data were analyzed with a linear model (GLM) and Duncan 's test. Results showed that breed influence sperm motility and MDA levels but not in the membrane integrity (MI) and viability. The FH bull had a low of recovery rate (RR) 57.53±1.74% with high MDA level (0.81±0.31 nmol/10⁸ sperm level) and Limousine had the highest RR (59.70±3.23%) with the low MDA (0.52±0.25 nmol/10⁸ sperm). Freezing decreased the sperm motility, viability and MI of all bulls. Sperm motility, viability and MI decreased by 28.32±1,45% and 29.73±1.54%, 21.58±4.09% and 22.55±5.60% and 21.25±6.86% and 23.51±6.05 % respectively.

Key Words: Freezing, Bulls, Freezing Capability, Malondialdehyde

ABSTRAK

Sukmawati E, Arifiantini RI, Bambang Purwantara. 2014. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. JITV 19(3): 168-175. DOI: <http://dx.doi.org/10.14334/jitv.v19i3.1079>

Rendahnya kualitas sperma sesudah proses pembekuan dan thawing karena adanya perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim. Tujuan dari penelitian ini adalah menguji daya tahan sperma terhadap pembekuan pada berbagai rumpun (jenis) pejantan unggul serta mengevaluasi kerusakan membran sperma melalui pengukuran kadar malondialdehyde (MDA) dari pejantan Simmental, Limousin dan FH. Masing-masing sebanyak 10 ekor pejantan unggul umur 4-8 tahun. Tiap rumpun pejantan kualitasnya digunakan dalam penelitian ini. Data dianalisis dengan model linier (GLM) dan uji Duncan's. Hasil penelitian menunjukkan rumpun pejantan mempengaruhi motilitas dan kadar MDA semen beku tetapi tidak pada ketahanan membran (MPU) dan viabilitas. Sapi FH memiliki daya tahan terhadap pembekuan yang rendah dengan nilai recovery rate (RR) 57,53±1,74% dan kadar MDA 0,81±0,31 nmol/10⁸ sperma, sedangkan limousin memiliki RR yang paling tinggi yaitu 59,70±3,23% dan kadar MDA 0,52±0,25 nmol/10⁸ sperma. Pembekuan menurunkan motilitas, viabilitas dan MPU sperma pada semua rumpun sapi, dengan tingkat penurunan motilitas, viabilitas dan MPU masing-masing 28,32±1,45% dan 29,73±1,54%; 21,58±4,09% dan 22,55±5,60% serta 21,25±6,86% dan 23,51±6,05%.

Kata Kunci: Pembekuan, Sapi, Daya Tahan, Malondialdehyde

PENDAHULUAN

Program inseminasi buatan (IB) di Indonesia telah menunjukkan perkembangan yang luar biasa. Pelaksanaan IB sebagian besar menggunakan semen beku yang diproduksi oleh dua balai inseminasi buatan tingkat nasional yaitu Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari dan Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang serta 17 Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) yang tersebar di berbagai provinsi. Semen beku untuk program IB diproduksi dengan persyaratan mutu yang ditetapkan oleh Badan Standarisasi Nasional (BSN) dan tertuang dalam standar mutu produksi semen beku sapi sesuai dengan SNI 4869.1: 2008. Beberapa syarat mutu tersebut meliputi daya tahan terhadap

pembekuan yang rutin dilakukan yakni motilitas pasca thawing lebih dari 40% dan gerakan individu 2-3.

Semen beku memiliki keunggulan dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama namun memiliki kelemahan yaitu kualitas semen setelah pembekuan dapat menurun. Penurunan kualitas sangat tinggi sekitar 50% sperma akan mati selama pembekuan dan sperma yang bertahan hidup umumnya mempunyai fertilitas yang rendah (Lessard et al. 2000). Hal ini terjadi karena selama proses pembekuan dan thawing sperma melewati berbagai perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim dan memicu produksi *reactive oxygen species* (ROS) (Nebel 2007; Moore et al. 2005). Kadar

ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA (Sharma & Agarwal 1999).

Salah satu kerusakan pada sperma selama proses pembekuan sampai pencairan kembali adalah peroksidasi lipid (Waluyo 2006). Membran plasma sperma memiliki fosfolipid yang mengandung asam lemak tak jenuh sehingga sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Radikal bebas akan merangsang terjadinya reaksi autokatalitik yang akan merusak ikatan ganda penyusun membran sel. Hal ini menunjukkan bahwa membran sperma adalah target utama ROS dan lipid merupakan sasaran yang potensial (Sanocka & Kurpisz 2004). Peroksidasi lipid yang berkepanjangan akan merusak struktur matriks lipid dan menyebabkan membran sel tidak stabil, mengubah fungsi membran serta menurunkan fluiditas membran sperma (Hayati et al. 2006). Bentuk dan ciri kerusakan sel sperma akibat peroksidasi lipid ialah menurunnya motilitas dan kapasitas fertilisasi, kerusakan enzim intraseluler dan kerusakan struktur membran plasma (Guthrie & Welch 2012).

Oksidasi lipid pada membran sperma menghasilkan senyawa *malondialdehyde* (MDA) yang bersifat toksik pada sel (Sanocka & Kurpisz 2004). Senyawa ini mempunyai berat molekul rendah dan merupakan satu dari beberapa molekul hasil penguraian endoperoksida lipid yang terbentuk selama proses peroksidasi lipid. Peningkatan kadar MDA biasa digunakan sebagai salah satu indikator untuk peroksidasi lipid membran (Halliwell & Gutteridge 1999).

Karakteristik biokimia dan fisiologik antar semen berbeda, sehingga membutuhkan tes tambahan dalam penilaian kualitas semen selain motilitas dan gerakan individu yaitu viabilitas dan membran plasma utuh serta pengukuran kadar MDA. Penelitian ini bertujuan untuk menguji daya tahan sperma terhadap pembekuan (*freezing capability*) pada berbagai rumpun pejantan unggul serta mengevaluasi kerusakan membran sperma dalam pengencer skim-kuning telur melalui pengukuran kadar MDA.

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan bulan Juli sampai bulan Desember tahun 2013 di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Bandung dan di Laboratorium Biokimia Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) Institut Pertanian Bogor.

Penelitian menggunakan semen sapi pejantan unggul rumpun Simmental, Limousin dan FH masing-masing 10 ekor umur 4-8 tahun.

Penyiapan bahan pengencer

Bahan pengencer yang digunakan adalah susu skim kuning telur. Sebanyak 10 g skim milk (Tropicana Slim) dilarutkan sampai dengan 100 ml aquadest. dipanaskan sampai suhu 90-92°C selama 10 menit. Setelah dingin disaring dan ditambahkan antibiotik (Penicillin 100.000 IU dan Streptomycin 100 mg dalam larutan 10 ml aquadest). Perbandingan antibiotik dan larutan skim adalah 1 : 100. Pengencer semen beku adalah 86 ml susu skim yang telah diberi antibiotik, 5 ml kuning telur, 8 ml gliserol ditambah 1 g glukosa.

Koleksi dan evaluasi semen

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan sesuai standar operasional prosedur Balai Inseminasi Buatan Lembang. Frekuensi penampungan dua kali/minggu/pejantan. Penelitian menggunakan empat ejakulat dari masing-masing pejantan yang digunakan sebagai ulangan. Segera setelah koleksi, semen dievaluasi secara makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi dan pH serta secara mikroskopis meliputi persentase motilitas, viabilitas, morfologi (normalitas dan abnormalitas spermatozoa), keutuhan membran spermatozoa (MPU) dan konsentrasi spermatozoa per ml (Arifiantini 2012). Hanya semen yang memiliki gerakan massa $\geq ++$ dan motilitas $\geq 70\%$, abnormalitas $< 20\%$ dan konsentrasi $> 1.000 \times 10^6$ ml digunakan dalam penelitian ini.

Pengenceran, pengemasan dan pembekuan semen

Semen yang memenuhi persyaratan diencerkan dengan konsentrasi 100×10^6 sperma perml kemudian diequilibrasi dalam *cool top* (4-5°C) selama 3 jam. Setelah itu dikemas dalam ministraw 0,25 ml (Minitube Jerman) menggunakan mesin otomatis (Combo System Minitube Jerman). Setiap straw mengandung 25×10^6 sperma motil. Semen dibekukan dalam uap N₂ cair selama 7 menit (Digitcool 5300 ZB 250 IMV Prancis). Mesin diprogram dengan laju penurunan 3°C/menit dari suhu +4°C ke -10°C. 40°C/menit dari suhu -10°C ke -100°C dan 20°C/menit dari suhu -100°C ke -140°C. Proses terakhir adalah pencelupan sperma ke dalam N₂ cair suhu -196°C dan penyimpanan.

Thawing semen beku

Thawing (pencairan kembali) semen dilakukan 24 jam setelah penyimpanan pada suhu 37°C selama 30 detik. Setelah itu dilakukan pemeriksaan kualitas semen

meliputi persentase motilitas, viabilitas, MPU dan kadar MDA sperma ($\text{nmol}/10^8$ sperma).

Pengujian motilitas

Sebanyak 5 μl semen diteteskan di atas gelas obyek kemudian ditutup dengan gelas penutup. Motilitas sperma dinilai menggunakan mikroskop phase kontras (Olympus BX 53), pembesaran 200 X yang dilengkapi *heating table* (37°C) dan kamera video. Persentase motilitas sperma dinilai dari 0-100% pada 5 lapangan pandang sedangkan kecepatan sel bergerak antara 0-5 (Ax et al. 2000; Arifiantini 2012).

Rasio sperma hidup dan mati (viabilitas)

Satu tetes semen dengan dua tetes pewarna eosin dihomogenkan, dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan difiksasi di atas *heating table*. Perhitungan dilakukan pada 10 lapangan pandang dengan jumlah sperma minimal 200 sel (Arifiantini 2012) menggunakan mikroskop (Olympus BX 51) pembesaran 400 X. Sperma yang mati akan menyerap warna sedangkan yang hidup tidak menyerap warna (transparan).

Keutuhan membran plasma (MPU)

Keutuhan membran plasma dilakukan menggunakan *osmotic resistance test* (ORT) atau *hypoosmotic swelling* (HOS) test (Fonseca et al. 2005). Sebanyak 50 μL semen dimasukkan dalam 1000 μl larutan HOS (1,351g fruktosadan 0,735g Na-sitrat dalam 100 ml aquadest dengan osmolaritas 150 m osmol), dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Satu tetes larutan yang telah diinkubasi diteteskan di atas gelas obyek kemudian ditutup dengan gelas penutup. Evaluasi dilakukan secara acak dari 10 lapangan pandang minimal 200 sperma. Dihitung menggunakan mikroskop phase kontras pembesaran 400 X. Sperma yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggembung sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus.

Pengujian kadar MDA

Pengujian kadar MDA menggunakan metode asam thiobarbituric sperma sesuai metode Anghel et al. (2009). Sebanyak 1 ml semen yang sudah di *thawing*, disentrifus 1000 x g (10 menit). Supernatan dibuang

dan pelet sperma dicuci 2 kali dengan Tris HCl pH 7.1 kemudian tambah aquadest 1 ml dan *reagen* Thiobarbituric Acid 0.5 ml. (TBA; 0.67 g asam 2-thiobarbituric ad 100 ml air suling dengan 0,5 g NaOH ad 100 ml asam asetat glacial). Sampel dipanaskan dalam penangas air (90°C) selama 1 jam, disentrifus 4000 x g (10 menit). Supernatan yang dihasilkan akan berwarna pink dan diukur absorbannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm. Koefisien MDA: $1,56 \times 10^5/\text{M}/\text{cm}$ hasil dinyatakan dalam nmoles MDA/ 10^8 sperma.

Analisis data

Analisa kualitas semen dilakukan per rumpun menggunakan Anova dan disajikan dalam rataan dan standar deviasi. Model Linier (GLM) digunakan untuk mengetahui pengaruh rumpun pejantan terhadap kualitas semen dan uji Duncan's digunakan untuk mengetahui perbedaan nilai yang diperoleh. Perbedaan dianggap signifikan pada $P < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar

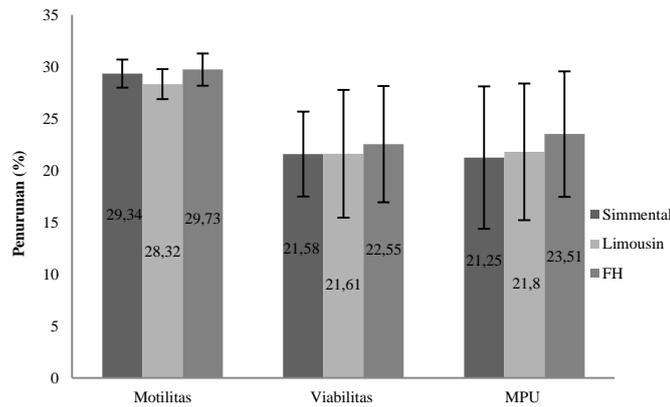
Sel sperma adalah sel yang unik dengan dua bagian utama yaitu kepala dan ekor yang berperan dalam proses pembuahan. Ekor sperma berfungsi untuk pergerakan sperma sedangkan kepala berfungsi pada reaksi akrosom dan fusi membran. Secara makroskopis volume semen yang didapat antara 6,05-8,77 ml, pH 6,56-6,57, berwarna putih susu-krem, konsistensi sedang. Secara mikroskopis motilitas sperma antara 70,00-70,63%, viabilitas antara 83,10-84,12% dan MPU antara 82,97-84,37% dengan konsentrasi sperma antara $1096,63 \times 10^6$ - $1153,64 \times 10^6$ per ml (Tabel 1). Semua nilai tersebut dalam kisaran semen yang normal menurut Garner & Hafez (2000).

Kualitas semen beku

Pada saat proses pembekuan dan *thawing* sperma mengalami berbagai perubahan suhu dan tekanan osmotik sehingga menurunkan kualitas semen diantaranya adalah penurunan motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh. Pengaruh rumpun pejantan terhadap penurunan kualitas sperma ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 1. Karakteristik semen segar dari berbagai rumpun sapi

| Karakteristik semen | Simmental | Limousin | FH |
|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Makroskopis | | | |
| Volume (ml) | 7,00±1,10 | 6,05±1,21 | 8,77±1,76 |
| pH | 6,57±0,04 | 6,57±0,06 | 6,56±0,04 |
| Warna | Susu-krem | Susu-krem | Susu |
| Mikroskopis | | | |
| Gerak massa | ++ | ++ | ++ |
| Motilitas individu (%) | 70,63±1,06 | 70,25±0,79 | 70,00±0,00 |
| Viabilitas (%) | 83,10±1,77 | 83,59±2,54 | 84,12±1,30 |
| Konsentrasi (10 ⁶ /ml) | 1129,75±180,99 | 1153,64±127,50 | 1096,63±111,30 |
| MPU (%) | 82,97±2,72 | 84,10±2,34 | 84,37±1,56 |



Gambar 1. Penurunan kualitas sperma pada berbagai rumpun sapi

Pengaruh pembekuan terhadap motilitas sperma

Motilitas merupakan salah satu parameter yang paling sering digunakan untuk mengevaluasi fertilitas sperma. Motilitas sperma bergantung pada fungsi mitokondria. *Adenosine Tri Phosphate* (ATP) dihasilkan oleh fosforilasi oksidatif di dalam membran mitokondria dan ditransfer ke mikrotubulus untuk motilitas. Oleh karena itu menurunnya motilitas sperma akibat pembekuan diyakini terkait dengan kerusakan mitokondria (Januskauskas & Zillinskas 2002; Ruiz-Pesini et al. 2001).

Pada penelitian ini, motilitas sperma pasca *thawing* mengalami penurunan yang cukup signifikan pada semua rumpun sapi yang diuji (Tabel 2).

Sapi rumpun FH memiliki motilitas sperma pasca *thawing* 40,27±1,10% lebih rendah ($P<0,05$) dibandingkan dengan Limousin (41,93±2,63%) dan simmental (41,29±1,64%). Total penurunan motilitas pada Limousin 28,32±1,45% lebih rendah dibandingkan

dengan FH 29,73±1,54% dan Simmental 29,34±1,363% ($P<0,05$). Penurunan motilitas tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan laporan penelitian sebelumnya yaitu 30% (Kim et al. 2013). Hasil analisis diketahui bahwa motilitas sperma dipengaruhi oleh rumpun sapi sebagai sumber semen. Perbedaan motilitas antar rumpun sapi diduga disebabkan karena kualitas genetik masing-masing pejantan.

Cerolini et al. (2001), Dziekonska et al. (2009) dan Gillan et al. (2004) menyatakan pendinginan dan pemanasan kembali akan merusak lipoprotein yang ada pada membran sperma. Perubahan struktur yang dihasilkan dalam membran sel sperma setelah *thawing* terutama terkait dengan kemampuan untuk mengubah sumber energi, hal ini memengaruhi metabolisme seluler dan fungsi sperma lain seperti motilitas. Ditambahkan oleh Chenoweth (2005) bahwa faktor genetik, umur, rumpun ternak serta variasi individu

Tabel 2. Penurunan motilitas sperma setelah pembekuan pada berbagai rumpun sapi

| Motilitas (%) | Rumpun sapi | | |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Simmental | Limousin | FH |
| Semen segar | 70,63 ^a ±2,32 | 70,25 ^a ±1,10 | 70,00 ^a ±0,00 |
| Semen beku | 41,29 ^a ±1,64 | 41,93 ^a ±2,63 | 40,27 ^b ±1,10 |
| Total penurunan | 29,34 ^a ±1,36 | 28,32 ^b ±1,45 | 29,73 ^a ±1,54 |
| <i>Recovery rate</i> | 58,46 ^a ±1,06 | 59,70 ^b ±3,23 | 57,53 ^a ±1,74 |

Superskrip huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

dapat memengaruhi ketahanan sel sperma terhadap cekaman suhu (*thermal shock*) pada saat proses *thawing* berlangsung.

Motilitas sperma dapat terjadi jika sperma mempunyai membran yang berfungsi dengan baik untuk menghasilkan energi gerak. Selama pembekuan terjadi perubahan suhu dan osmolalitas yang ekstrim sehingga akan merusak komposisi lipid membran plasma yang berdampak pada menurunnya motilitas sperma.

Kualitas sperma yang dihasilkan oleh setiap rumpun dan individu berbeda-beda sehingga berpengaruh terhadap kualitas sperma beku yang dihasilkan. Hal ini terbukti dari perbedaan nilai *recovery rate* (RR) yaitu kemampuan sperma untuk pulih kembali dari proses pembekuan dengan membandingkan persentase sperma motil setelah *thawing* dengan semen segar (Garner & Hafez 2000). Hasil perhitungan nilai RR untuk Limousin adalah 59,70±3,23% lebih tinggi (P<0,05) dari Simmental 58,46±1,06% dan FH 57,53±1,74% sehingga Limousin dianggap memiliki ketahanan sperma terhadap pembekuan yang lebih baik dibandingkan dengan FH dan Simmental.

Pengaruh pembekuan terhadap viabilitas sperma

Pengujian viabilitas sperma digunakan sebagai indikator integritas struktur membran. Pada penelitian ini, total penurunan viabilitas sperma antara Simmental, Limousin dan FH tidak berbeda (P>0,05) berkisar antara 21,58±4,09% dan 22,55±5,60% (Tabel 3).

Viabilitas sperma setelah *thawing* lebih sedikit bila dibandingkan dengan semen segar. Hal ini disebabkan suhu yang sangat rendah saat pembekuan

mengakibatkan bocornya substansi vital dalam sperma sehingga enzim intraseluler, lipoprotein, ATP dan kalium intraseluler berkurang menyebabkan kerusakan membran plasma sehingga nilai viabilitas menurun.

Penurunan viabilitas masih tergolong normal karena menurut Lessard et al. (2000) penurunan kualitas sperma sesudah pembekuan sangat tinggi sekitar 50% sperma mati selama pembekuan dan sperma yang bertahan hidup umumnya mempunyai fertilitas yang rendah. Zahn et al. (2006) menyatakan bahwa komposisi protein plasma semen dan membran sperma bervariasi antar individu dan berhubungan dengan ketahanan sperma terhadap pembekuan. Selain itu protein plasma semen seperti osteopontin dan lipocalin-rumpun prostaglandin D synthase bervariasi antara pejantan. Komposisi plasma semen tidak homeostatis dan bervariasi tidak hanya antar spesies, tetapi juga di antara individu dan antar ejakulasi dari hewan yang sama (Garner & Hafez 2000). Adanya Perbedaan karakteristik seminal plasma antar individu dan antar semen dari koleksi hewan yang sama tentu saja memengaruhi kualitas semen beku yang dihasilkan.

Hilangnya viabilitas sperma tidak bisa dihindari karena selama pengolahan semen, sperma mengalami perubahan kondisi lingkungan yang sangat ekstrim. Lemma (2011) menyatakan ada dua rentang suhu yang rentan terhadap kerusakan sperma selama pembekuan yaitu periode pendinginan (0°C sampai -5°C) dan pembentukan kristal es (-6°C sampai -15°C). Hal ini juga telah disampaikan sebelumnya oleh Park dan Graham (1993) bahwa kerusakan pertama pada membran sperma terjadi pada proses pembekuan dan *thawing* antara suhu -15 sampai -60°C tetapi tidak terjadi selama penyimpanan di nitrogen cair.

Tabel 3. Penurunan viabilitas sperma setelah pembekuan pada berbagai rumpun sapi

| Viabilitas (%) | Rumpun sapi | | |
|-----------------|-------------|------------|------------|
| | Simmental | Limousin | FH |
| Semen segar | 83,10±3,02 | 83,59±5,52 | 84,11±2,69 |
| Semen beku | 61,52±3,43 | 61,98±3,72 | 61,56±4,31 |
| Total penurunan | 21,58±4,09 | 21,61±6,16 | 22,55±5,60 |

Tabel 4. Penurunan MPU sperma setelah pembekuan pada berbagai rumpun sapi

| MPU (%) | Rumpun sapi | | |
|-----------------|-------------|------------|------------|
| | Simmental | Limousin | FH |
| Semen segar | 82,97±5,57 | 84,10±5,99 | 84,36±3,36 |
| Semen beku | 61,72±6,64 | 62,29±5,79 | 60,85±5,71 |
| Total penurunan | 21,25±6,86 | 21,80±6,58 | 23,51±6,05 |

Pengaruh pembekuan terhadap keutuhan membran plasma sperma

Pengukuran MPU dengan metode HOST digunakan untuk evaluasi fungsional dari integritas membran sperma. Integritas membran adalah suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran yang terjaga sebagai kontrol terhadap transport ion, sehingga cairan di luar sel tidak dapat memasuki sel. Apabila membran plasma rusak maka proses metabolisme akan terganggu, sintesa ATP tidak berjalan dengan normal dan berakibat fatal bagi sperma yaitu menurunnya motilitas maupun daya tahan hidup sperma itu sendiri.

Pendinginan merupakan pemicu stres sperma karena akan merubah konfigurasi dari fosfolipid membran plasma dan mengganggu fungsi dan permeabilitas membran sel (Cooter et al. 2005; Watson 2000; Wongtawan et al. 2006). Hasil penelitian menunjukkan penurunan MPU pada rumpun sapi FH sebesar 23,51±6,05%, Simmental 21,25±6,86% dan Limousin 21,80±6,58% ($P>0,05$) (Tabel 4).

Penurunan persentase MPU tersebut masih lebih rendah dibanding laporan penelitian sebelumnya yaitu 25% (Mondal et al. 2010). Proses pembekuan menyebabkan membran plasma rusak sebagai akibat terbentuknya peroksidasi lipid yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi membran dan ketika dicairkan menyebabkan perubahan aktivitas protein dan perubahan permeabilitas terhadap air dan zat terlarut. Persentase MPU yang bervariasi terjadi karena adanya karakteristik biofisik dan biokimia dari membran sperma.

Situmorang (2002) menyatakan akibat pembekuan terjadi penurunan kandungan fosfolipid dan kolesterol pada masing-masing bangsa dan individu pejantan. Kedua senyawa tersebut merupakan komponen membran. Fosfolipid berfungsi untuk melindungi sel spermatozoa dari *cold shock* sedangkan kolesterol berperan penting dalam menjaga integritas sel spermatozoa dari variasi sistem membran yang bertambah selama proses pendinginan. Cerolini et al. (2001), Dziekonska et al. (2009) dan Gillan et al. (2004) juga menyatakan bahwa pendinginan dan pemanasan kembali akan merusak lipoprotein yang ada pada membran sperma. Perubahan struktur yang dihasilkan

dalam membran sel sperma setelah *thawing* terutama terkait dengan kemampuan untuk mengubah sumber energi. Hal ini memengaruhi metabolisme seluler dan fungsi sperma seperti motilitas.

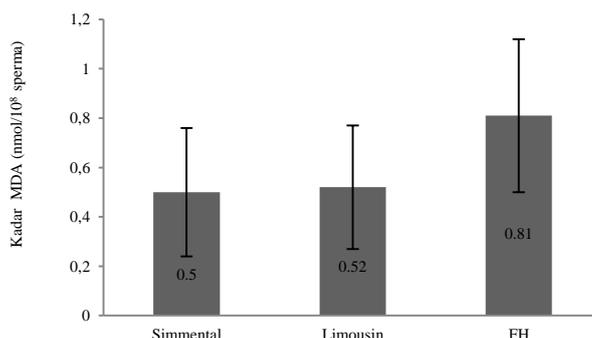
Masing-masing spesies hewan mengandung komposisi membran yang berbeda. Hal ini menyebabkan efek pendinginan berbeda sehingga *cryosensitivity* yang berbeda pula di berbagai spesies. Karakteristik membran yang memengaruhi sensitivitas diantaranya rasio kolesterol/fosfolipid dan rasio protein/fosfolipid. Fleisch & Gadella (2000) menyatakan terdapat korelasi yang kuat antara kandungan kolesterol membran dengan tingkat keutuhan membran sperma. Komposisi plasma semen juga dapat memengaruhi stabilitas membran plasma (Baas dalam Zahn 2006).

Rasio kolesterol dan fosfolipid membran sperma berbeda-beda antar spesies. Resistensi terhadap *cold shock* lebih tinggi pada spesies yang mengandung kolesterol yang lebih besar untuk rasio fosfolipid dan saturasi yang lebih besar dengan ikatan gugus asil. Sperma sapi memiliki kolesterol yang lebih tinggi dari pada kuda dan babi (Parks & Lynch dalam Meyers 2005). Penambahan kolesterol semen dapat meningkatkan *cryosurvival* dari sperma (Farshad 2011).

Kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada berbagai rumpun sapi

Malondialdehyde merupakan salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi asam lemak tak jenuh sebagai konsekuensi dari peningkatan konsentrasi senyawa ROS dalam sel. Peningkatan kadar MDA ini biasa digunakan sebagai salah satu indikator peroksidasi lipid membran. Tingginya Kadar MDA menunjukkan terjadinya kerusakan membran sperma yang tinggi pula. Keadaan ini diindikasikan dengan menurunnya persentase integritas normal membran. Kadar MDA tiap rumpun pejantan ditunjukkan pada Gambar 2.

Kadar MDA tertinggi terdapat pada sapi FH 0,81±0,31 nmol/10⁸ sperma ($P<0,05$) dibandingkan Simmental dan Limousin. Kedua rumpun sapi tersebut mempunyai kadar MDA yang hampir sama yaitu 0,50±0,26 dan 0,52±0,25 nmol/10⁸ sperma.



Gambar 2. Kadar MDA sperma pasca *thawing* pada berbagai rumpun sapi

Sapi FH mengalami peroksidasi lipid yang lebih tinggi akibat penurunan suhu yang ekstrim dan meningkatnya konsentrasi ROS dalam sel sperma. Argaman et al. (2013) melaporkan bahwa sapi FH sangat rentan terhadap proses oksidasi karena memiliki kandungan asam lemak tak jenuh ganda yang sangat tinggi dalam sperma. Tingginya konsentrasi asam lemak tak jenuh dalam fosfolipid pada membran sperma rumpun FH menjadi sasaran utama untuk reaksi dengan agen oksidasi dan berpartisipasi dalam rantai panjang reaksi radikal bebas (Marnet LJ 2000).

Bailey et al. (2000) menyatakan masing-masing sperma mempunyai sensitivitas yang berbeda-beda terhadap kerusakan peroksidatif, hal ini disebabkan adanya variasi komposisi dari membran plasma sperma. Setiap individu memiliki kualitas sperma yang berbeda meskipun dipelihara dengan sistem dan manajemen pakan yang seragam. Kondisi masing-masing individu seperti kualitas organ reproduksi juga akan memengaruhi kualitas semen dan kadar MDA yang dihasilkan. Selain itu rumpun pengencer semen yang digunakan juga akan memengaruhi kadar MDA. Sebagai bahan perbandingan, kadar MDA pada penelitian sebelumnya yaitu $2,63 \pm 0,70$ nmol/10⁹ sperma dalam pengencer sitrat-kuning telur dan $5,62 \pm 1,05$ nmol/10⁹ dalam pengencer Tris-kuning telur (Asadpour et al. 2011) sedangkan dalam pengencer Bioxcell[®] $0,70 \pm 0,13$ nmol/10⁸ sperma (Sariozkan et al. 2009).

KESIMPULAN

Rumpun sapi FH memiliki daya tahan terhadap pembekuan (*freezing capability*) yang sangat rendah dan sensitivitas tinggi terhadap kerusakan peroksidatif dibandingkan Limousin dan Simmental. Kerusakan membran akibat pembekuan (kadar MDA) antara 0,50-0,81 nmol/10⁸ sperma.

Pemberian antioksidan seperti vitamin E sebaiknya diberikan pada beberapa pejantan yang mempunyai kadar *malondialdehyde* (MDA) tinggi sebagai penangkap radikal bebas dan memperlambat berlangsungnya reaksi peroksidasi lipid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan kepada Kepala Balai Inseminasi Buatan Lembang dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui program Bantuan Operasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN) yang diwadahi oleh Lembaga Penelitian dan Pengembangan Masyarakat Institut Pertanian Bogor (LPPM IPB).

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Makker K, Sharma R. 2008. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility. *J Reprod Immunol.* 59:2-11.
- Andrabi SMH. 2007. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull sperm. Mini review. *Int J Agric Biol.* 9:367-369.
- Anghel AH, Zamfirescu S, Coprean D. 2009. Influence of vitamin E on microscopic dan oxydative parameters of frozen-thawed ram semen. *Lucrari Stiintifice.* 53:635-639.
- Argaman NA, Mahgrefthe K, Zeron Y, Roth Z. 2013. Variation in lipid profiles within semen compartment the bovine model of aging. *Theriogenol.* 80:712-721.
- Arifiantini I. 2012. Teknik koleksi dan evaluasi semen pada hewan. Bogor (Indones): IPB Press.
- Asadpour R, Jafari R, Tayefi NH. 2011. Effect of various levels of catalase antioxidant in sperm extenders on lipid peroxidation and sperma quality after the freeze-thawing bull sperm. *Vet Res Forum.* 2:218-221.

- Ax RL, Dally N, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Semen evaluation. dalam: B Hafez & ESE Hafez. Reproduction in farm animals. 7th ed. Lippincot Williams & Wilkins Philadelphia USA. hlm. 365-375.
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon. *J Androl.* 21:1-7.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of Boar semen. *Reproduction.* 121:395-401.
- Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion sperm. *Anim Reprod Sci.* 108:298-308.
- Cooter PZ, Goolsby HA, Prien SD. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine sperm cryopreservation. *Reprod Dom Animal.* 40:98-99.
- Dziekońska A, Fraser L, Strzeżek J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of sperm following liquid storage of Boar semen. *J Anim Feed Sci.* 18:638-649.
- Fonseca JF, CAA Tores, Maffi Li VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveira RFM. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat sperm. *Anim Reprod.* 2:139-144.
- Garner DLE, Hafez SE. 2000. Sperm and Seminal Plasma. In: B Hafez & ESE Hafez. Reproduction in farm animal. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. hlm. 96-109.
- Gillan L, Maxwell WMC, Evans G. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod Fertil Dev.* 16:447-454.
- Guthrie HD, Welch GR. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Sci Verse Science Direct. Theriogenol.* 78:1700-1708.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford University Press.
- Hayati A, Mangkoewidjojo S, Hinting A, Moeljopawiro S. 2006. Hubungan kadar MDA sperma dengan integritas membran sperma tikus (*Rattus nervegicus*) setelah pemaparan 2-Mothoxyethanol. *Berk Penel Hayati.* 11:151-154.
- Januskauskas A, Zillinskas H. 2002. Bull semen evaluation post-thaw and relation of semen characteristics to bull's fertility. *Veterinarija ir Zootechnika.* 17:1392-2130.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl.* 21:700-707.
- Mondal M, Karunakaran M, Kyung BL, Chandan R. 2010. Characterization of mithun (*Bos frontalis*) ejaculates and fertility of cryopreserved sperm. *Anim Reprod Sci.* 118:210-216.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiol.* 51:241-249.
- Nebel RL. 2007. Techniques for artificial insemination of cattle with frozen thawed semen. in: *Current Therapy In Large Animal Theriogenol.* 2nd ed. Saunders Elsevier. Missouri.
- Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez J, Lopez Perez M. 2001. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J androl.* 24:335-340.
- Sanocka D, Kurpisz M. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endoc.* 2:1-7.
- Sariozkan S, Purhan BT, Mustafa NB, Pinar AU. 2009. Influence of various antioxidants on microscopic-oxidative stress indicators and fertilizing ability of frozen-thawed bull sperms. *Acta Vet BRNO.* 78:463-469; doi : 10.2754/avb200978030463.
- Sharma RK, Agarwal A. 1999. Role of reactive oxygen species in male infertility. *J Urol.* 48:835-850.
- Situmorang P. 2002. Pengaruh kolesterol terhadap daya hidup dan fertilitas spermatozoa sapi. *JITV.* 7:251-258.
- Watson PF. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 60-61:481-492.
- Wongtawan T, Saravia F, Wallgren M, Caballero I, Rodriguez MH. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenol.* 65:773-787.
- Zahn FS, Papa FO, Melo CM. 2006. Blood Serum. Seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions; are they correlated to semen freezability?. *Anim Reprod Sci.* 94:64-66.