

**PENGARUH PENAMBAHAN BERBAGAI DOSIS TOKOFEROL DALAM
PENGECER SUSU SKIM TERHADAP MOTILITAS DAN INTEGRITAS
MEMBRAN PLASMA SPERMATOZOA SEMEN BEKU
KAMBING PERANAKAN ETAWAH (PE)**

Arifiantini, R.I.¹⁾, W. Indri W.²⁾, dan W. Hidayat³⁾

¹⁾ Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan IPB

²⁾ Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Yogyakarta

³⁾ Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan IPB

ABSTRACT

The aim of this experiment was to identify the influence of various doses of tocoferol as antioksidant in skim milk extender on the sperm motility and plasma membrane integrity of frozen semen from Etawah-cross Bucks. Semen was collected from eight Etawah-cross bucks by using artificial vagina and evaluated macro and microscopically. The collected semen were diluted in skim milk extender with various doses of tocoferol (0.0 ; 0.2 and 0.3 gr/100ml). Prior to freezing in liquid nitrogen by minitube sistem, the semen was equilibrated at 5°C for 4 hours. The motility and plasma membrane integrity was evaluated before and after freezing. The result of the experiment revealed that the influence of various doses (0.0 ; 0.2 and 0.3 ml/100ml) of tocoferol on the sperm motility and plasma membrane integrity of frozen semen from Etawah-cross bucks were not significantly different ($P>0.05$). However, Skim milk with concentration of 0.3 % (w/v) tocoferol gave the highest average on preserve sperm motility and plasma membrane integrity compare to 0.0 % and 0.2 % dose.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai dosis tokoferol sebagai antioksidan terhadap motilitas dan integritas membran plasma spermatozoa semen beku kambing Peranakan Etawah (PE). Semen dikoleksi dari delapan ekor kambing PE dengan menggunakan vagina buatan, kemudian dilakukan pemeriksaan standar terhadap semen segar. Semen dengan kualitas yang baik diencerkan dengan pengencer susu skim yang mengandung berbagai dosis tokoferol (0,0 ml/100ml; 0,2 ml/100ml dan 0,3 ml/100ml). Setelah equilibrasi pada suhu 5°C selama 4 jam, semen kemudian dibekukan dengan menggunakan sistem minitube. Evaluasi terhadap motilitas dan persentase Membran Plasma yang Utuh (MPU) dilakukan pada saat setelah pengenceran (sebelum pembekuan) dan setelah pencairan kembali (setelah pembekuan). Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara statistik tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P>0.05$) antara dosis tokoferol 0,0; 0,2 dan 0,3 ml/100ml dalam hal mempertahankan motilitas dan % MPU spermatozoa semen beku kambing PE.

PENDAHULUAN

Penerapan teknologi Inseminasi Buatan pada ternak kambing sebagai usaha untuk memperbaiki produktifitas kambing lokal dan untuk mempercepat penyebaran populasi kambing dengan mutu genetik yang lebih baik, sampai saat ini masih dalam penelitian. Keberadaan enzim fosfolipase A dalam plasma semen dan rendahnya viabilitas dan fertilitas spermatozoa semen kambing sering menjadi faktor pembatas keberhasilan inseminasi buatan pada ternak kambing (Situmorang, 1990).

Salah satu penyebab rendahnya kemampuan spermatozoa dalam proses fertilisasi adalah kerusakan membran plasma selama penanganan semen akibat reaksi peroksidasi oleh radikal-radikal bebas lipid yang dihasilkan selama proses metabolisme spermatozoa (Parks and Graham, 1992). Penambahan suatu antioksidan seperti tokoferol ke dalam pengencer susu skim diharapkan mampu untuk mengikat radikal-radikal bebas yang dihasilkan sehingga proses peroksidasi membran tidak terjadi yang pada akhirnya akan mempertahankan fertilitas.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini menggunakan semen segar dari 8 ekor kambing PE yang ditampung secara periodik dengan menggunakan vagina buatan. Semen yang dikoleksi dievaluasi dengan prosedur pemeriksaan standar meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis (volume, warna, bau, konsistensi, pH, gerakan massa, motilitas, konsentrasi, persentase Membran Plasma yang Utuh (MPU), % hidup dan % abnormal). Semen dengan kualitas yang baik diencerkan dengan pengencer susu skim yang telah ditambah dengan berbagai dosis tokoferol (0,0; 0,2, dan 0,3 gr/100ml). Selanjutnya dilakukan equilibrasi pada suhu 5 °C selama 4 jam.

Pembekuan dilakukan dengan menggunakan sistem minitube dalam uap nitrogen cair (-130 °C). Evaluasi terhadap motilitas dan persentase MPU dilakukan sebelum dan setelah pembekuan. Persentase Motilitas dievaluasi dengan menggunakan haemositometer sedangkan persentase Membran Plasma Utuh (MPU) diperiksa menggunakan metode HOS (Hipoosmotik Swelling) tes dengan larutan hipoosmotik NaCl 0,179 gr/100ml.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisa covarian dengan rancangan acak lengkap, bila hasil menunjukkan perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji lanjutannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengamatan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Kambing PE.

Hasil penampungan dari setiap ejakulat didapatkan volume semen kambing PE rata-rata $1,30 \pm 0,28$ ml. Rata-rata volume semen tersebut masih berada dalam kisaran normal seperti yang dikemukakan oleh Jainudeen dan Hafez (1987); 0,1 – 1,5 ml serta Evans dan Maxwell (1987); 0,5-1,5 ml. Bervariasinya volume semen ini tergantung dari umur, bangsa, bobot badan, tingkat gizi pakan serta frekuensi penampungan. Warna semen yang dihasilkan pejantan PE adalah krem hingga kuning dan mempunyai konsistensi kental hingga encer. Hasil ini sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh Evans dan Maxwell (1987). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pH semen kambing PE rata-rata $7,10 \pm 0,11$. Nilai pH ini lebih rendah bila dibandingkan dengan hasil yang didapat oleh Sandhi dkk.. (1989) yaitu rata-rata $7,54 \pm 0,14$ (SD).

Dari hasil pengamatan secara mikroskopis didapat gerakan massa rata-rata (+++) yang menunjukkan bahwa kualitas semen cukup tinggi. Motilitas spermatozoa Kambing PE sebelum pengenceran rata-rata $73,70 \pm 2,54$ %. Hasil ini sesuai dengan yang didapat oleh Devendra dan Burns (1994) yaitu 50 – 90 % tetapi lebih tinggi bila dibandingkan dengan hasil yang didapat oleh Sandhi dkk.. (1989) rata-rata $60 \pm 2,13$ %.

Tabel 1. Kualitas Makroskopis dan Mikroskopis Semen Kambing PE.

Parameter	Rataan
Warna	Krem
Konsistensi	Sedang
Bau	Khas
Gerakan Massa	(+++)
Volume	1,30 ml
PH	7,10
Konsentrasi	3.100 juta sel/ml
% Motil	73,70 %
% Hidup	82,29 %
Abnormalitas	6,56 %
% MPU	80,90 %

Konsentrasi rata-rata dari hasil pengamatan adalah 3.100×10^6 spermatozoa/ml. Hasil ini sesuai dengan pendapat Evans dan Maxwell (1987); $2500 - 5000 \times 10^6$ spermatozoa/ml; Hafez (1985) $2000 - 6000 \times 10^6$ spermatozoa/ml serta Devendra dan Burns (1994) $1800 - 4000 \times 10^6$ spermatozoa/ml. Umur, kualitas pakan yang diberikan, serta ukuran testis sangat berpengaruh terhadap variasi konsentrasi spermatozoa kambing. Konsentrasi semen dapat juga dinilai dari gerakan massa spermatozoa.

Persentase hidup spermatozoa kambing jantan PE diperoleh rata-rata $82,29 \pm 5,79 \%$ sedangkan abnormalitas spermatozoa rata-rata $6,56 \pm 3,05 \%$. Nilai abnormalitas ini lebih rendah dari yang didapatkan oleh Sandhi dkk. (1989) yaitu $8,76 \pm 1,39 \%$.

Menurut Jayendran dan Zaneveld (1986) membran plasma yang utuh dan fungsional akan bertambah volumenya jika dimasukkan ke dalam larutan hiposmotik sehingga akan terlihat bengkak atau ekornya melingkar. Hasil dari Pengamatan didapatkan persentase MPU spermatozoa semen segar seekor kambing P.E. adalah rata-rata $80,90 \pm 3,56 \%$.

4.2. Persentase Motilitas Dan Persentase MPU Setelah Pembekuan

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan (setelah thawing) tidak berbeda secara statistik untuk ketiga dosis tokoferol. Namun demikian apabila dilihat dari nilai rata-ratanya susu skim dengan dosis tokoferol 0,3 % (v/v) memberikan rata-rata hasil yang lebih tinggi yaitu ($52,79 \pm 5,24 \%$) dibanding dengan dosis 0,0 %/tanpa tokoferol ($45,16 \pm 4,03 \%$) dan dosis 0,2 % ($47,04 \pm 5,04$). Persentase Motilitas sebelum dan setelah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan Motilitas Spermatozoa Sebelum dan Sesudah Pembekuan

Parameter	Dosis tokoferol		
	0,0 %	0,2 %	0,3 %
Sebelum pembekuan	$69,95 \pm 3,75$	$70,73 \pm 2,39$	$70,85 \pm 3,73$
Setelah pembekuan	$45,16 \pm 4,03^a$	$47,04 \pm 5,04^a$	$52,79 \pm 5,42^a$

Keterangan : huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $P > 0,05$

Persentase MPU juga menunjukkan tidak ada perbedaan nyata dari ketiga dosis tokoferol. Tetapi ada kecenderungan bahwa pengencer dengan dosis tokoferol 0,3 % dapat mempertahankan % MPU yang lebih baik yaitu $44,33 \pm 2,51 \%$ dibanding dengan dosis 0,2

% ($43,68 \pm 4,11$ %) dan dosis 0,0 % ($39,21 \pm 4,34$ %). Rataan persentase MPU sebelum dan setelah pembekuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Persentase MPU Sebelum dan Sesudah Pembekuan

Parameter	Dosis tokoferol		
	0,0 %	0,2 %	0,3 %
Sebelum pembekuan	$70,97 \pm 7,79$	$75,94 \pm 4,14$	$73,34 \pm 3,54$
Setelah pembekuan	$39,21 \pm 4,34^a$	$43,68 \pm 4,11^a$	$44,33 \pm 2,51^a$

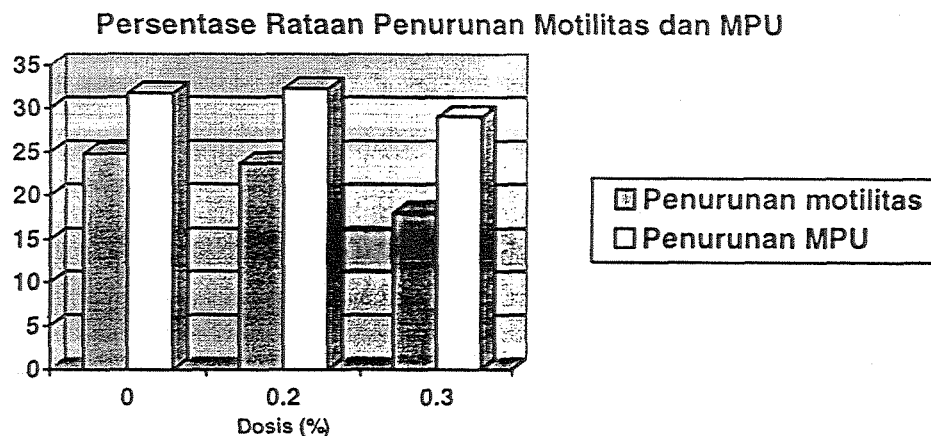
Keterangan : huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $P>0,05$

Penurunan persentase motilitas dan membran plasma yang utuh juga memberikan hasil yang tidak berbeda nyata untuk ketiga jenis perlakuan. Susu skim dengan dosis tokoferol 0,3 % cenderung lebih sedikit penurunannya dibanding dua dosis lainnya. Penurunan motilitas pada dosis 0,3 % adalah $18,07 \pm 8,94$ % lebih rendah dari dosis 0,2 % ($23,69 \pm 3,26$ %) dan dosis 0,0 % ($24,79 \pm 8,13$ %). Tabel 4 dan Gambar 1 menggambarkan persentase penurunan motilitas dan persentase MPU.

Tabel 4. Persentase Penurunan Motilitas Spermatozoa dan MPU

Parameter	Dosis tokoferol		
	0,0 %	0,2 %	0,3 %
Penurunan motilitas	$24,79 \pm 8,13^a$	$23,69 \pm 3,26^a$	$18,07 \pm 8,94^a$
Penurunan % MPU	$31,76 \pm 4,74^a$	$32,27 \pm 7,18^a$	$29,01 \pm 5,11^a$

Keterangan : huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $P>0,05$

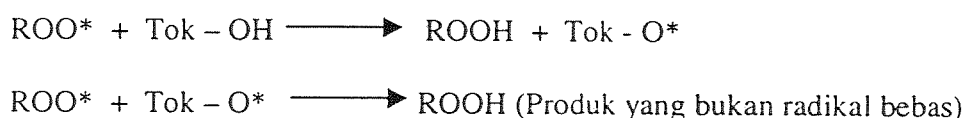


Gambar 1 : Persentase penurunan motilitas dan MPU

Dari ketiga parameter yang diamati terlihat bahwa pengaruh ketiga dosis tokoferol tidak berbeda nyata dalam mempertahankan persentase motilitas dan persentase keutuhan

membran plasma, walaupun bila dilihat dari nilai rata-ratanya dosis 0,3 % cenderung memberikan hasil yang lebih baik dari dua dosis lainnya. Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian Feradis (1999) pada domba St. Croix, dimana pada penelitiannya peneliti ini menemukan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara dosis tokoferol 0,0%; 0,1% dan 0,2%. Peneliti ini mengemukakan bahwa susu skim dengan dosis 0,2% memberikan hasil yang terbaik. Perbedaan pengaruh penambahan tokoferol antara semen kambing dan domba, dimungkinkan karena sifat fisiologis semen kedua hewan tersebut berbeda, sehingga dosis optimum tokoferol yang ditambahkan juga berbeda.

Kecenderungan lebih baiknya persentase motilitas dan MPU pada susu skim dengan penambahan tokoferol dibanding dengan susu skim tanpa penambahan tokoferol menunjukkan bahwa tokoferol mempunyai peranan, walaupun tidak nyata, dalam mempertahankan motilitas dan keutuhan membran. Hal ini diduga karena sifat antioksidan dari tokoferol yang dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid dengan cara mengikat radikal-radikal bebas lipidik penyebab peroksidasi lipid membran sehingga menjadi senyawa yang stabil. Secara skematik reaksi tokoferol dapat dilihat di bawah ini.



Gambar 2. Aktifitas tokoferol dengan memutus ikatan yang dimilikinya (Tok - OH) terhadap radikal peroksil (ROO*) Mayes (1995)

Menurut Jones dan Mann (1977) peroksidasi lipid berbahaya bagi spermatozoa karena dapat menurunkan viabilitas dan fertilitas spermatozoa yaitu hilangnya motilitas yang ireversibel, keluarnya enzim-enzim intraseluler yang penting untuk proses fertilisasi, menghambat fruktolisis dan respirasi serta rusaknya membran plasma spermatozoa.

Kerusakan pada membran plasma spermatozoa akan mengakibatkan terganggunya transport aktif zat-zat yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa seperti glukosa, asam amino dan asam lemak. Akibat terganggunya mekanisme ini maka spermatozoa akan kekurangan energi sehingga viabilitas akan menurun termasuk motilitasnya. Rusaknya membran plasma juga akan mengganggu keseimbangan ion-ion yang esensial bagi spermatozoa.

Penambahan suatu antioksidan seperti tokoferol didalam pengencer akan mencegah terjadinya peroksidasi sehingga gangguan-gangguan metabolisme di atas tidak akan terjadi yang akhirnya akan menjamin ketersediaan energi bagi kelangsungan hidup spermatozoa.

Tokoferol sebagai salah satu antioksidan larut lemak utama yang terdapat dalam sistem biologis dapat menangkap radikal-radikal bebas yang dihasilkan selama proses metabolisme spermatozoa. Menurut Belsbois *et al.* (1993) pengaruh protektif yang spesifik dari tokoferol erat kaitannya dengan lokalisasinya yang dekat dengan posfolipid di dalam membran sel, sehingga efisiensi penambahan tokoferol sangat tergantung pada seberapa banyak tokoferol dapat diakumulasikan di dalam membran plasma spermatozoa. Hal ini menunjukkan betapa pentingnya "carier" tokoferol yang membawa tokoferol dari luar masuk ke dalam membran. Adanya perbedaan efektifitas penambahan tokoferol antara satu spesies dengan spesies yang lain mungkin juga terkait dengan berbedanya jumlah "carier" tokoferol untuk setiap spesies, disamping sifat fisiologis semennya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan tokoferol pada pengencer susu skim tidak nyata pengaruhnya terhadap motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa semen beku kambing PE, tetapi secara umum terdapat kecenderungan bahwa pengencer susu skim dengan dosis tokoferol 0,3 % dapat mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasma yang lebih baik dari dosis 0,0 % dan 0,2 %.

Melihat adanya kecenderungan di atas maka perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut dengan dosis yang lebih besar untuk melihat dosis tokoferol yang paling optimum dalam mempertahankan motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa kambing PE. Studi lebih lanjut mengenai mekanisme kerja tokoferol di dalam membran plasma juga perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Belsbois, E, I. Grasseau and J.C. Blum. 1993. Effect of Vitamin E on Foels Semen Storage at 4 °C. *Theriogenology* 39:771-779.
- Devendra, C and M Burns. 1994. Produksi Kambing di Daerah Tropis. Terjemahan I.D.K. Harya Putra. Penerbit ITB. Bandung.

- Evans, G and WMC. Maxwell. 1987. Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworth. Sydney.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan Dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus Pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix. Desertasi. Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Bogor.
- Jainudeen, M.R., and E.S.E. Hafez. 1987. Reproductive Cycle of Sheep and Goats in E.S.E. Hafez. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febriger. Philadelphia.
- Jones, T. and T. Mann. 1977. Toxicity of Exogenous Fatty Acid Peroxides Towards Spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 50:255-260.
- Parks, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effect of Cryopreservation Procedures on Sperm Membrane. *Theriogenology* 38:209-222.
- Sandhi, G.N.,G.G. Mayun, M. Pastika, P. Sartini dan SGN Darmadja. 1989. Umur Pubertas dan Beberapa Performans Reproduksi Kambing Jantan Peranakan Etawah. Proc. Pertemuan Ilmiah Ruminansia. 2:160-163. Puslitbangnak. Bogor
- Situmorang, P. 1990. The survivability of thawed goat-semen following freezing to 196 °C. *Ilmu dan Peternakan* 4(2): 274-277