

ULASAN

Kriopreservasi Sel Spermatozoa

Cryopreservation of Sperm

MUHAMAD GAZALI^{1*}, SURYA NATAL TAMBING²

¹Jurusan Peternakan, Faperta, Universitas 45 Makassar, Jalan Urip Sumohardjo Km. 4, Makassar 90231

²Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Selatan Km. 17.5 Sudiang, Makassar 90242

Diterima 17 Juli 2001/Disetujui 5 Desember 2001

Cryopreservation of sperm is a procedure for storing the suspension of sperm at temperature colder than 0°C. The basic principle of cryopreservation is the movement of water across cell membranes, both to dehydrate cells prior to freezing and to rehydrate them at thawing. There are two major phenomenons during cryopreservation of sperm i.e., cold shock and the formation of ice crystals. Cryopreservation also makes sperm susceptible to damage from peroxidation. Besides that, there are anti-freezing factors in the seminal plasma (e.g., egg-yolk coagulating and triglycerol lipase enzyme, and anti-motility factor) which adversely damage of intracellular organelles, decrease the motility and metabolism processes, but increase the process of removing several enzymes out from the cell. In order to minimize cryoinjury in spermatozoa, it is necessary to consider many factors i.e., use of proper diluent media, types and doses of cryoprotectant, types and doses of antioxidant, doses of egg-yolk and remove anti-freezing factors in the seminal plasma.

Kriopreservasi merupakan suatu teknik penyimpanan sel hewan, tumbuhan ataupun materi genetika lain (termasuk semen dan oosit) dalam keadaan beku melalui reduksi aktivitas metabolisme tanpa mempengaruhi organel-organel di dalam sel sehingga fungsi fisiologi, biologi, dan morfologi tetap ada. Metode kriopreservasi sel spermatozoa dibedakan atas pembekuan lambat (*slow freezing*), pembekuan cepat (*rapid freezing*), dan pembekuan sangat cepat (*ultra rapid freezing*). Prinsip yang terpenting dari kriopreservasi sel spermatozoa ialah pengeluaran air dari dalam sel (dehidrasi) sebelum membeku intraseluler. Bila tidak terjadi dehidrasi akan terbentuk kristal es besar dalam sel yang dapat merusak sel dan bila terjadi dehidrasi yang sangat hebat maka sel akan mengalami kekeringan sehingga sel mati (Supriatna & Pasaribu 1992). Perhatian harus difokuskan pada prinsip perpindahan air keluar masuk membran, baik dehidrasi sebelum *deep freezing* maupun rehidrasi pada saat pencairan kembali (*thawing*).

Pada dasarnya tujuan utama kriopreservasi sel spermatozoa ialah melestarikan plasma nutfah yang mendekati kepunahan dan mendukung program teknologi inseminasi buatan (IB) pada ternak. Keuntungan kriopreservasi sel spermatozoa ialah sel spermatozoa dapat disimpan dalam waktu yang tidak terbatas dan dapat digunakan kapan saja bila diperlukan (Toelihere 1985).

Faktor yang Mempengaruhi Penurunan Viabilitas Sel Spermatozoa Selama Proses Kriopreservasi

Ada dua faktor utama selama proses kriopreservasi sel spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin (*cold-shock*) dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal es. Selain itu ada beberapa faktor tambahan, yaitu peroksidasi lipid dan faktor antibeku pada plasma semen seperti *egg-yolk coagulating enzyme*, trigliserol lipase, dan faktor antimotilitas.

Kejutan Dingin. Kejutan dingin terjadi karena adanya penurunan suhu secara mendadak pada suhu tubuh sampai di bawah 0°C yang akan menurunkan viabilitas sel. Fenomena kejutan dingin pada sel belum diketahui secara jelas, akan tetapi kemungkinan berkaitan dengan tahap transisi dari membran lipid yang menyebabkan terjadinya tahap pemisahan dan penurunan sifat-sifat permeabilitas secara selektif dari membran biologi sel hidup (Watson 1995). Tingkat sensitivitas sel terhadap kejutan dingin dipengaruhi oleh tingkat pendinginan dan interval suhu (Watson 2000).

Dua tipe kerusakan pada sel akibat kejutan dingin dapat terjadi secara langsung dan tidak langsung yang bersifat laten (Amann 1999). Kerusakan langsung akan mempengaruhi struktur dan fungsi seluler, misalnya penurunan proses metabolisme spermatozoa, sedangkan kerusakan tidak langsung sulit untuk diamati dan baru terlihat setelah proses pencairan kembali. Pengaruh utama dari kejutan dingin terhadap sel spermatozoa ialah penurunan motilitas dan daya

* Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-411-452901, 452789, Fax. +62-411-452949

hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Jumlah spermatozoa motil mengalami penurunan disertai pelepasan enzim, perpindahan ion melewati membran, dan penurunan kandungan lipid seperti fosfolipid dan kolesterol yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas struktur membran plasma (Weitze & Petzoldt 1992, White 1993) serta penurunan kemampuan sel spermatozoa untuk mengontrol aliran Ca^{2+} (Bailey & Buhr 1994).

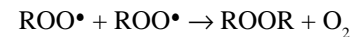
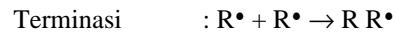
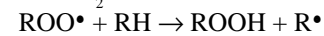
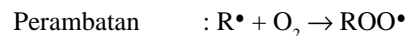
Pembentukan Kristal Es. Pembentukan kristal es selama proses kriopreservasi sel spermatozoa menyebabkan terjadinya penumpukan elektrolit di dalam sel. Hal tersebut mengakibatkan terjadi kerusakan sel secara mekanik. Elektrolit yang menumpuk akan merusak dinding sel sehingga pada waktu pencairan kembali permeabilitas membran plasma akan menurun dan sel akan mati. Pembentukan kristal es kemungkinan berkaitan dengan perubahan tekanan osmotik dalam fraksi yang tidak mengalami pembekuan (Watson 2000).

Perubahan fisik di dalam sel selama kriopreservasi berkaitan dengan derajat penurunan suhu. Prinsip utama dari derajat penurunan suhu ialah kecepatan optimum yang dapat memberi kesempatan air keluar dari sel secara kontinu bertahap sebagai respons sel terhadap kenaikan konsentrasi larutan ekstraseluler yang semakin tinggi di antara kristal es yang terbentuk. Jika derajat penurunan suhu berlangsung lambat, air akan banyak keluar dari sel untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi air intraseluler dan ekstraseluler serta terjadi dehidrasi untuk menghindari pembekuan intraseluler. Apabila media pengencer didinginkan di bawah tingkat pendinginan maka kristal es menggumpal dan air akan mengalami pengkristalan keluar sebagai es (Watson 2000). Jika derajat penurunan suhu berlangsung cepat, keseimbangan potensial air akan terganggu dan air intraseluler akan membeku. Pada derajat penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang halus di dalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar. Kondisi ini akan mengakibatkan kerusakan dan kematian sel (Park & Graham 1992).

Pengaruh yang ditimbulkan pada sel spermatozoa akibat pembentukan kristal es ialah penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa, peningkatan pengeluaran enzim intraseluler ke luar sel, dan kerusakan pada berbagai organel seperti lisosom dan mitokondria (Dhami & Sahni 1993). Lisosom yang pecah akan mengeluarkan asam hidrokortase sehingga akan mencerna bagian sel yang lain, sedangkan mitokondria yang rusak akan menyebabkan putusannya rantai oksidasi. Akibatnya, pergerakan spermatozoa terhenti karena tidak ada lagi pasokan energi dari organel mitokondria yang berfungsi merangsang fungsi mikrotubula. Hal tersebut akan mengakibatkan spermatozoa dapat bergerak secara bebas atau bersifat motil progresif.

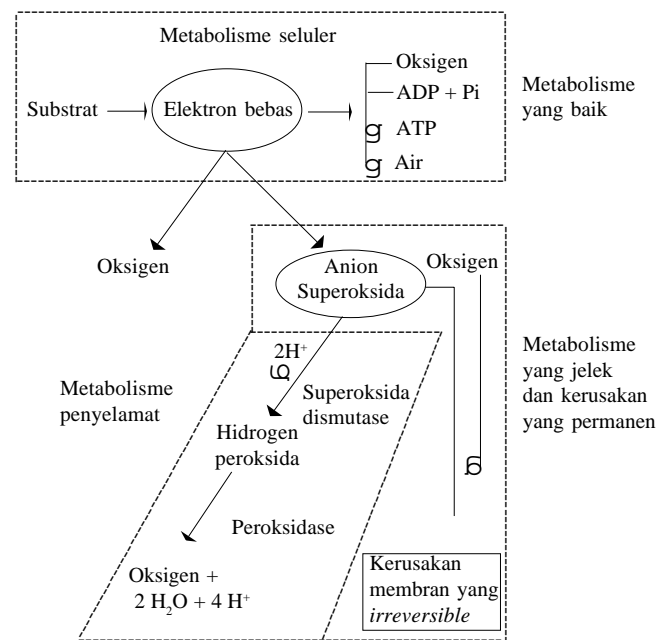
Peroksidasi Lipid. Spermatozoa dapat bergerak secara bebas karena adanya gerakan flagela. Flagela ini memiliki struktur kompleks dan motor penggerak utamanya ialah

aksonema. Aksonema dibentuk oleh mikrotubula yang berasal dari sentriol pada inti spermatozoa. Pergerakan atau motilitas spermatozoa yang progresif disebabkan oleh pergesekan antarmikrotubula karena adanya oksigen yang berasal dari *dynein*. Oksigen akan diubah dari energi kimia menjadi energi mekanik. Oleh karena itu, ketersediaan oksigen dalam jumlah yang cukup sangat diperlukan oleh spermatozoa. Kelebihan oksigen akan menimbulkan kerusakan akibat peroksidasi lipid pada sel spermatozoa. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya radikal bebas, yaitu senyawa kimia yang memiliki pasangan elektron yang tidak berpasangan. Radikal-radikal bebas tersebut antara lain superoksida (O_2^{\bullet}), hidroksil (OH^{\bullet}) dan peroksil (ROO^{\bullet}). Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dan bila bereaksi dengan asam lemak tak jenuh akan membentuk lipid peroksidasi (Siregar 1992).



Reaksi ini terjadi secara berantai dan terus-menerus karena radikal bebas mengakibatkan dihasilkan peroksidasi lebih lanjut.

Peroksidasi lipid secara total sangat sulit untuk dihindari dan bila terus berlanjut akan menyebabkan ketidakstabilan membran, mengubah viskositas membran dan merangsang aktivasi fosfolipase A_2 . Eliminasi peroksidasi lipid sulit terjadi karena proses metabolismenya berhubungan erat dengan alur metabolisme esensial yang disajikan pada Gambar 1. Metabolisme seluler yang bersifat aerob dan menyebabkan terjadinya sintesis ATP bergantung pada pelepasan elektron bebas. Reaksi samping dari elektron ini dengan oksigen dapat



Gambar 1. Mekanisme kejadian proses peroksidasi (Hammerstedt 1993).

menghasilkan anion superoksida, yang akan menyebabkan kerusakan sel. Sel yang mengandung cukup superoksida dismutase dan peroksidase dapat mengeluarkan anion superoksida dan akan meminimumkan kerusakan peroksidatif. Efek toksik yang ditimbulkan dari peroksidasi lipid terhadap sel mamalia mencakup penghambatan metabolisme oksidatif, penghambatan glikolisis, lisis pada eritrosit, oksidasi sulfhidril dan penghambatan kerja enzim -SH, modifikasi protein dan asam amino, kerusakan membran dan inaktivasi enzim pengikat membran, serta denaturasi DNA (White 1993).

Timbulnya peroksidasi lipid selama proses pembekuan semen mempengaruhi kerusakan pada sel spermatozoa. Kerentanan spermatozoa terhadap peroksidasi lipid disebabkan oleh fosfolipid membran plasma sel spermatozoa mamalia mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap serangan radikal bebas dan merangsang terjadinya reaksi autokatalitik yang akan merusak ikatan gandanya (Maxwell & Watson 1996).

Peroksidasi lipid berperan utama dalam proses penuaan dan memperpendek daya hidup spermatozoa dan mempengaruhi preservasi semen untuk inseminasi buatan. Hal tersebut akan menginduksi perubahan struktur terutama pada daerah akrosom, kehilangan motilitas secara cepat dan tidak dapat pulih kembali. Di samping itu terjadi perubahan metabolisme dan pelepasan komponen intraseluler dalam jumlah besar. Peroksidasi lipid yang berkepanjangan akan merusak struktur matriks lipid dan menyebabkan membran sel tidak stabil. Bentuk dan ciri kerusakan sel spermatozoa akibat peroksidasi lipid ialah rendahnya motilitas dan kapasitas fertilisasi, kerusakan enzim intraseluler (seperti: aspartat transaminase = AST, alanina transaminase = ALT, alkalin fosfatase = ALP, *acid phosphatase* = ACP, dan laktat dehidrogenase = LDH) dan kerusakan struktur membran plasma terutama pada bagian akrosom (White 1993, Upreti *et al.* 1996, Maxwell & Watson 1996).

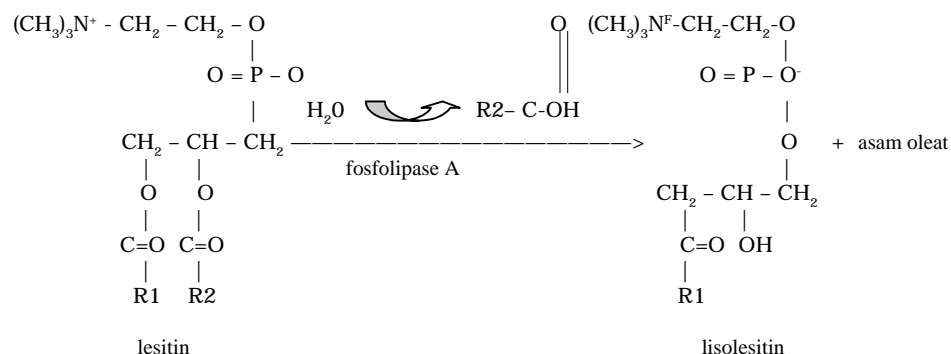
Faktor Antibeku pada Plasma Semen. Faktor antibeku yang terdapat dalam plasma semen mamalia ialah *egg-yolk coagulating enzyme*, trigliserol lipase, dan faktor antimotilitas.

Egg-yolk coagulating enzyme (EYCE) merupakan salah satu enzim antibeku yang terdapat pada plasma semen kambing. EYCE diduga ialah enzim fosfolipase A yang disekresikan oleh kelenjar bulbouretralis (kelenjar *cowper*). Bila bereaksi dengan kuning telur yang terdapat dalam media pengencer akan mengakibatkan kematian spermatozoa. Enzim

fosfolipase-A menguraikan lesitin dari kuning telur menjadi lisolesitin dan asam lemak tak jenuh yang bersifat toksik (Evans & Maxwell 1987). Menurut Voet dan Voet (1990) pembentukan lisolesitin terjadi karena fosfolipase-A memutus gugus R₂ dari lesitin yang digantikan oleh asam oleat suatu asam lemak tak jenuh (Gambar 2). Toksisitas dari EYCE bergantung pada pH, suhu, konsentrasi plasma semen, musim produksi semen, dan kandungan kuning telur. Terdapat hubungan linear antara aktivitas penggumpalan dengan konsentrasi EYCE dalam jumlah terbatas pada plasma semen ataupun pada kelenjar bulbouretralis (Leboeuf *et al.* 2000).

Trigliserol lipase terdapat dalam plasma semen kambing, disekresikan oleh kelenjar bulbouretralis dan bila berinteraksi dengan pengencer susu skim akan sangat responsif untuk menekan daya hidup spermatozoa kambing. Komponen kelenjar bulbouretralis telah dimurnikan dan diidentifikasi sebagai trigliserol lipase, yaitu monomer 55-60 kDa *N*-glikosil-protein (*BUSgp60*) yang memperlihatkan daya ikat terhadap heparin (Leboeuf *et al.* 1998). Trigliserol lipase ini akan merangsang penurunan motilitas spermatozoa, merusak akrosom, dan mematikan sel spermatozoa kambing bila dicampur dengan pengencer susu skim. Seperti diketahui bahwa susu skim merupakan media isotonik yang mengandung beberapa komponen yang dapat mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa akibat pengaruh kejutan dingin. Pengaruh trigliserol lipase dalam pengencer susu skim diantarkan melalui proses hidrolisis trigliserida susu sehingga mengakibatkan terjadinya pelepasan asam lemak tak jenuh, yakni asam oleat dari sisa susu skim yang akan merusak spermatozoa kambing (Leboeuf *et al.* 2000).

Faktor antimotilitas ditemukan pada plasma semen, khususnya pada semen kerbau. Bila semen kerbau dibekukan maka faktor ini akan dilepaskan sehingga akan menurunkan motilitas spermatozoa kerbau setelah pencairan kembali. Mekanisme kerja faktor ini masih belum diketahui secara pasti, akan tetapi diduga merupakan nitrogen bukan protein (*non protein nitrogen/NPN*) yang mempunyai potensi untuk berubah menjadi amoniak. Perubahan tersebut akan mengganggu proses metabolisme, motilitas dan membunuh spermatozoa. Kandungan NPN dalam plasma semen kerbau sebesar 109 mg/100 ml dan lebih tinggi bila dibandingkan plasma semen sapi (48 mg/100 ml) (Battacharya 1974). Amoniak merupakan salah satu senyawa yang dapat



Gambar 2. Reaksi pembentukan lisolesitin (Voet & Voet 1990). R1 = asam stearat, R2 = asam oleat.

menembus membran plasma sel secara langsung sehingga akan menimbulkan efek toksik dan akan menghambat proses-proses biokimia di dalam sel spermatozoa.

Upaya Meminimumkan Penurunan Viabilitas Sel Spermatozoa Selama Proses Kriopreservasi Bahan Pengencer

Untuk menjamin terpenuhinya kebutuhan fisik dan kimia sehingga spermatozoa dapat mempertahankan kelangsungan hidupnya selama proses kriopreservasi perlu ditambahkan bahan pengencer. Secara umum bahan pengencer terdiri atas tiga bagian, yaitu (i) bahan dasar, seperti kuning telur, air kelapa, air susu; (ii) bahan penyanggah, seperti natrium-kalium bikarbonat, asam sitrat, tris; dan (iii) bahan tambahan, seperti gliserol dan antibiotika (Toelihere 1985). Fungsi bahan pengencer ialah merupakan sumber energi, melindungi sperma terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat, mencegah pengaruh yang merugikan seperti perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, meningkatkan volume semen sehingga dapat digunakan untuk inseminasi dan memproteksi sel spermatozoa selama pembekuan (Hafez 2000).

Beberapa jenis bahan pengencer yang sering digunakan dalam pembekuan semen hewan mamalia antara lain ialah glukosa, laktosa, sakarosa, sitrat, susu skim, dan tris. Glukosa, laktosa, dan sakarosa merupakan sumber energi sehingga spermatozoa tetap bertahan hidup selama proses pembekuan. Sitrat berperanan sebagai komponen penyangga sehingga dapat mempertahankan pH semen secara fisiologi. Susu skim memiliki kelebihan sebagai media isotonik dan antikejutuan dingin karena banyak mengandung komponen yang menguntungkan untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa. Tris memiliki kelebihan sebagai pengencer karena memiliki kapasitas penyangga yang baik dan mampu mempertahankan tekanan osmotik karena mengandung garam-garam dan asam amino.

Bahan pengencer yang digunakan dalam pembekuan semen bervariasi di antara spesies hewan mamalia. Semen sapi lebih cocok menggunakan pengencer dasar susu skim (Vishwanath & Shannon 2000), sedangkan untuk semen kerbau lebih cocok menggunakan laktosa karena menghasilkan persentase motilitas spermatozoa sesudah pencairan kembali lebih tinggi (65.7%) dibandingkan Tris (60.2%) dan susu skim (54.4%) (Situmorang 1993). Penggunaan susu skim sebagai pengencer dasar dalam proses pembekuan semen domba ternyata menghasilkan angka pembuahan yang lebih tinggi (50.7%) pada saat IB dibandingkan sitrat (32%), laktosa (46%), Tris (37.9%), rafinosa (35.3%), dan sakarosa (40.7%) (Salamon & Maxwell 1995). Pada semen kambing justru pengencer dasar Tris lebih mempertahankan viabilitas spermatozoa sesudah pencairan kembali (persentase motilitas 62.5%) dibandingkan susu skim (persentase motilitas 48.0%) (Sahni & Tiwari 1992). Hal ini terjadi karena setiap semen hewan mamalia memiliki

daya toleransi yang berbeda-beda terhadap setiap jenis bahan pengencer.

Penggunaan Antioksidan. Antioksidan ialah senyawa nukleofilik yang mempunyai potensi melindungi sistem biologi akibat adanya suatu proses atau reaksi yang merugikan dengan jalan mereduksi, memadamkan ataupun menekan reaksi radikal bebas. Antioksidan diklasifikasikan dalam tiga kelompok, yaitu (i) antioksidan seperti vitamin E, *butylated hydroxytoluene* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *glutathione*, berperan menghambat oksidasi melalui reaksinya dengan radikal bebas dan menghambat reaksi rantai berikutnya; (ii) zat pereduksi seperti vitamin C, asam isoaskorbat, garam natrium, berperan melawan agens oksidasi dan dapat bereaksi dengan radikal bebas; dan (iii) antioksidan sinergi seperti asam sitrat, lesitin, asam tartarat, berperan meningkatkan aktivitas antioksidan kelompok pertama melalui perannya sebagai katalisator oksidasi dengan ion logam berat (Reynolds 1982).

Antioksidan yang umum digunakan dalam kriopreservasi semen hewan mamalia ialah vitamin C, vitamin E, BHT, BHA, dan glutathione. Vitamin C dapat melindungi membran plasma spermatozoa sapi selama proses pembekuan dan pencairan kembali. Penambahan vitamin E sebanyak 1 mg/ml dalam pengencer semen sapi dapat mengatasi cepat rusaknya membran plasma terhadap kejadian peroksidasi lipid, yang ditandai dengan kemampuannya melindungi aktivitas enzim superoksida dimustase (SOD), menurunkan produksi malondialdehida (MDA) dan mempertahankan integritas akrosom (Beconi *et al.* 1993). Reaksi yang mungkin terjadi pada fungsi vitamin E sebagai antioksidan ialah penggabungan antara α -tokoferol dengan protein yang ada pada membran sel (Nasoetion & Karyadi 1991). Antioksidan BHT dan BHA telah digunakan dalam pengencer semen domba untuk meminimumkan kejadian peroksidasi lipid. Watson dan Anderson (1983) melaporkan penggunaan BHT dengan dosis 2 mM dapat mempertahankan motilitas dan intak akrosom spermatozoa domba. Sedangkan penambahan BHA sebanyak 10 μ M dalam pengencer semen domba menghasilkan motilitas spermatozoa lebih baik (Upreti *et al.* 1997). Penggunaan glutathione dalam pengencer semen kambing sebanyak 5 mM menghasilkan persentase motilitas lebih tinggi (55.7%) disertai dengan abnormalitas akrosom rendah (6.22%) dan tingkat pelepasan enzim AST, ALT, dan LDH rendah (berturut-turut 218.88/10⁹, 180.56/10⁹, dan 1477.22/10⁹ spermatozoa) (Sinha *et al.* 1996).

Penggunaan Krioprotektan. Krioprotektan ialah zat kimia nonelektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan. Berdasarkan sifat-sifat fisikokimia dan daya permeabilitas membran maka krioprotektan dibagi atas dua kelompok, yaitu (i) krioprotektan intraseluler, dapat keluar masuk membran karena memiliki bobot molekul kecil sehingga bersifat permeabel (contoh: gliserol, etilen glikol, propanadiol), dan (ii) krioprotektan ekstraseluler, tidak dapat keluar masuk membran karena

memiliki bobot molekul besar sehingga bersifat nonpermeatif (contoh: protein, sukrosa, manosa, rafinosa, kuning telur, susu) (Supriatna & Pasaribu 1992, Amann 1999).

Krioprotektan yang paling banyak digunakan dalam pembekuan semen hewan mamalia yaitu gliserol. Gliserol mampu mengikat air yang cukup kuat karena adanya tiga gugus hidroksil yang dimilikinya. Gliserol dapat berdifusi ke dalam sel lebih cepat, mampu mengubah kristal es yang berukuran besar dan tajam, dan melenturkan membran sel sehingga tidak mudah rapuh (Supriatna & Pasaribu 1992).

Mekanisme pergerakan gliserol ke dalam sel spermatozoa belum diketahui secara pasti, tetapi kemungkinan melalui cara difusi sehingga dapat menembus dan memasuki sel spermatozoa yang digunakan spermatozoa untuk aktivitas metabolisme oksidatif. Selain itu, gliserol dapat menggantikan sebagian air yang bebas dan mendesak keluar elektrolit-elektrolit sehingga menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya rusaknya terhadap spermatozoa dengan jalan memodifikasi kristal es yang terbentuk (Toelihere 1985). Di dalam membran plasma, krioprotektan ini akan mengikat gugus pusat fosfolipid sehingga mengatasi ketidakstabilan membran serta berinteraksi dengan membran untuk mengikat protein dan glikoprotein sehingga menyebabkan partikel-partikel intramembran terkumpul (Park & Graham 1992).

Walaupun gliserol dapat memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa, namun dapat juga merusak struktur spermatozoa selama proses pembekuan semen, menyebabkan kejutan osmotik, dan menurunkan nilai antibiotika dalam pengencer semen, serta menurunkan volume sel sperma sebanyak setengah dari volume larutan isotonik sesudah pencairan kembali. Oleh karena itu, kandungan gliserol di dalam pengencer semen bergantung pada metode pendinginan/pembekuan, komposisi pengencer, dan cara penambahan.

Dosis gliserol dalam pengencer semen bervariasi di antara jenis ternak. Dosis optimum gliserol dalam pengencer semen sapi sebesar 7% (Vishwanath & Shannon 2000), semen kerbau 6% (Kumar *et al.* 1992) dan semen kambing 6-8% (Sinha *et al.* 1992, Das & Rajkonwar 1994, Tambing *et al.* 2000).

Penggunaan Kuning Telur. Kuning telur umumnya ditambahkan ke dalam pengencer semen sebagai sumber energi dan agens protektif. Khasiat kuning telur terletak pada: (i) kemampuannya mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein sel spermatozoa (Toelihere 1985), (ii) sifat penyanggah tekanan osmotik sehingga sel spermatozoa lebih toleran terhadap pengencer hipotonik dan hipertonic (Jones & Martin 1973), dan (iii) perlindungan terhadap pendinginan yang cepat dan pencegahan peningkatan aliran kalsium ke dalam sel yang dapat merusak spermatozoa (Park & Graham 1992, White 1993). Komponen spesifik kuning telur yang bertanggung jawab sebagai agens krioprotektif ialah lesitin, fosfolipid, ekstrak lipid, fraksi lipoprotein dan lipoprotein spesifik (Vishwanath & Shannon 2000).

Dosis kuning telur dalam pengencer semen bervariasi di antara jenis ternak. Dosis kuning telur yang umum digunakan dalam pengencer semen sapi 15% sampai 30% v/v

(Vishwanath & Shannon 2000), semen kambing 10-25% (Deka & Rao 1986, Tredjo *et al.* 1996), dan semen domba 1.5-3.0% (Salamon & Maxwell 1995).

Pengeluaran dan Penggantian Plasma Semen. Salah satu upaya mencegah pengaruh negatif dari *egg-yolk coagulating enzyme* dan trigliserol lipase terhadap semen kambing maupun faktor antimotilitas terhadap semen kerbau pada saat dibekukan ialah melalui pengeluaran dan disertai dengan penggantian dengan plasma semen jenis ternak lain. Pengeluaran plasma semen dilakukan segera setelah penampungan jauh sebelum proses pembekuan dilakukan. Metode pengeluaran plasma semen belum merupakan kesepakatan umum karena adanya anggapan bahwa beberapa komponen plasma semen hilang yang sangat diperlukan oleh spermatozoa selama perjalanannya dalam saluran reproduksi betina. Komponen penting tersebut ialah fruktosa yang berperan sebagai sumber energi dan agens pelindung, namun berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa pengeluaran yang disertai penggantian dengan plasma semen jenis ternak lain mampu memperbaiki kualitas semen beku. Penggantian plasma semen kerbau dengan plasma semen sapi terbukti mampu meningkatkan kualitas semen kerbau setelah pencairan kembali (Ahmad *et al.* 1996, Amin 1998). Hal yang sama terjadi pada semen kambing, pengeluaran plasma semen menghasilkan kualitas semen beku kambing sesudah pencairan kembali (motilitas 54.4% dan daya hidup 56.9%) lebih tinggi dibandingkan pada tanpa pengeluaran plasma semen (motilitas 38.5% dan daya hidup 49.0%) (Situmorang 1990).

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kriopreservasi sel spermatozoa merupakan upaya menyimpan sel spermatozoa dalam keadaan beku sehingga dapat dimanfaatkan setiap saat bila dibutuhkan dan digunakan dalam mendukung penerapan teknologi inseminasi buatan pada ternak. Oleh karena penyimpanannya dalam wadah yang mengandung nitrogen cair (suhu dibawah 0°C atau sekitar -196°C) akan menyebabkan terjadi perubahan fisiologi, biologi, dan morfologi dari sel spermatozoa. Untuk meminimumkan pengaruh yang merugikan terhadap sel spermatozoa selama proses kriopreservasi, beberapa hal yang perlu diperhatikan yaitu: media pengencer, jenis dan dosis krioprotektan, jenis dan dosis antioksidan, dosis kuning telur, dan pencegahan faktor antibeku yang terdapat pada plasma semen. Dengan memperhatikan faktor-faktor tersebut diharapkan fungsi fisiologi, biologi, dan morfologi tetap berjalan, dan pada akhirnya viabilitas sel spermatozoa dapat dipertahankan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad MA, Khan ZA, Shah, Ahmad KM. 1996. Effects of removal of seminal plasma on the survival rate of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 41:193-199.
- Amann RP. 1999. Cryopreservation of semen. Di dalam: *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 1 London: Academic. hlm 773-783.
- Amin MR. 1998. Efektivitas plasma semen sapi dan berbagai pengencer dalam meningkatkan kualitas semen beku kerbau lumpur (Bubalus bubalis). [Tesis]. Bogor: Insitut Pertanian Bogor.
- Bailey JL, Buhr MM. 1994. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can J Anim Sci* 74:45-51.

- Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchino MA. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40:841-852.
- Bhattacharya P. 1974. Reproduction of Buffalo. Roma: FAO.
- Das KK, Rajkonwar CK. 1994. Morphological of acrosome during equilibration and after freezing of buck semen with raffinosa egg yolk glycerol extenders. *Indian Vet J* 71:1098-1102.
- Deka BC, Rao AR. 1986. Effect of egg yolk levels on quality of frozen buck semen. *Indian Vet J* 63:909-912.
- Dhami AJ, Sahni KL. 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluent for effect on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of Taurine bull spermatozoa. *Theriogenology* 40:1269-1280.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. London: Butterworths.
- Hafez ESE. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. Di dalam: Hafez ESE, Hafez B (ed). *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke-7. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. hlm 431-442.
- Hammerstedt RH. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 5(6):675-690.
- Jones RC, Martin ICA. 1973. The effects of dilution egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 35:311-320.
- Kumar S, Sahni KL, Mohan G. 1992. Effect of different glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J* 2:151-156.
- Leboeuf B *et al.* 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livestock Prod Sci* 55:193-203.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 62:113-141.
- Maxwell WMC, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42:55-65.
- Nasoetion AH, Karyadi D. 1991. Vitamin. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222.
- Reynolds EF. 1982. Martindale; The Extra Pharmacopoeia. London: Pharmaceutical.
- Sahni KL, Tiwari S.B. 1992. Caprine semen evaluation, processing and artificial insemination in India. Di dalam: *Research on Goats Indian Experience*. Makhdoom-Mathura: Central Institute for Research on Goat. hlm 94-107.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995. Frozen storage of ram semen I: processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37:185-249.
- Sinha S, Deka BC, Tamulu MK, Borgohain BN. 1992. Effect of equilibration period and glycerol level in tris extender on quality of frozen goat semen. *Indian Vet J* 69:1107-1110.
- Sinha MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Anim Reprod Sci* 41:237-243.
- Siregar P. 1992. Metabolit oksigen radikal bebas dan kerusakan jaringan. *Cermin Dunia Kedokteran* 80:112-115.
- Situmorang P. 1990. The effect of diluent on the viability of washed and unwashed goat spermatozoa. *Ilmu dan Peternakan* 4:270-273.
- Situmorang P. 1993. Daya hidup spermatozoa kerbau sungai, kerbau lumpur dan persilangannya setelah dibekukan pada nitrogen cair. *Ilmu dan Peternakan* 6:6-10.
- Supriatna I, Pasaribu FH. 1992. *In Vitro Fertilization, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Bogor: PAU IPB.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Sutama IK. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer Tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *JITV* 5:84-91.
- Toelihere MR. 1985. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Tredjo AG, Anaya MJ, Hernandez GM. 1996. Effect of egg yolk concentration and the cooling rates on the sperm motility and acrosomal integrity of frozen caprine semen. Di dalam: *Proc. VI International Conference on Goats*, Beijing, 6-11 Mei 1996, Vol. 2:854-857.
- Upreti GC, Payne SR, Duganzich DM, Oliver JE, Smith JF. 1996. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 41:27-36.
- Upreti GC *et al.* 1997. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 48:269-278.
- Viswanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. *Anim Reprod Sci* 62:23-53.
- Voet D, Voet JG. 1990. *Biochemistry*. New York: J Wiley.
- Watson PF, Anderson WJ. 1983. Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J Reprod Fert* 69:229-235.
- Watson PF. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assesment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7:871-891.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61:481-492.
- Weitze KF, Petzoldt R. 1992. Preservation of semen. *Anim Reprod Sci* 28:229-235.
- White IG. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. A review. *Reprod Fertil Dev* 5:639-658.