

**VIABILITAS SPERMATOZOA KAMBING BOER PASCA PENDINGINAN
DAN PEMBEKUAN MENGGUNAKAN PENGECER DASAR TRIS DENGAN
LEVEL TREHALOSA YANG BERBEDA**

Nurul Isnaini

Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

ABSTRAK

Penyimpanan semen bisa dilakukan dengan pendinginan atau pembekuan. Setelah pendinginan atau pembekuan viabilitas spermatozoa akan menurun. Untuk dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa selama pendinginan atau pembekuan diperlukan krioprotektan dengan level tepat. Trehalosa merupakan krioprotektan ekstraseluler yang mampu menstabilkan membrane dan sebagai anti oksidan bagi spermatozoa selama pendinginan dan pembekuan sehingga diharapkan dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa. Masalah dalam penelitian ini adalah bagaimanakah peranan trehalosa pada level yang berbeda dalam pengencer dasar tris mampu menekan penurunan viabilitas spermatozoa kambing Boer selama pendinginan dan pembekuan? Tujuan dari penelitian ini adalah mengkaji pengaruh berbagai level trehalosa dalam pengencer dasar tris terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer setelah pendinginan dan pembekuan. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratorium. Penelitian terdiri atas 2 tahap. Tahap I. Pengaruh level trehalosa dalam pengencer tris terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer setelah pendinginan. Tahap 2. Pengaruh level trehalosa dalam pengencer tris terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer setelah pembekuan. Level trehalosa yang dicobakan pada masing-masing tahap adalah: 1,5%; 2,5% dan 3,5%, dan ulangan: 10 kali. Variabel yang diamati adalah viabilitas spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa level trehalosa berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa, baik setelah pendinginan maupun pembekuan. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dalam pendinginan dan pembekuan semen kambing Boer, masing-masing penambahan level 1,5% dan 2,5% dalam pengencer dasar tris menghasilkan viabilitas spermatozoa yang optimal. Dari hasil penelitian disarankan bahwa dalam pendinginan dan pembekuan semen kambing Boer sebaiknya ditambahkan trehalosa masing-masing 1,5% dan 2,5% dalam pengencer dasar tris agar mendapatkan viabilitas spermatozoa yang optimal.

Kata kunci: viabilitas spermatozoa, trehalosa, pendinginan, pembekuan, kambing Boer

**VIABILITY OF BOER GOAT SPERMATOZOA AFTER COOLING AND
FREEZING USING TRIS-BASED-SOLUTION SUPPLEMENTED WITH
DIFFERENT LEVEL OF TREHALOSE**

ABSTRACT

Semen storage could be conducted in cold or frozen condition. However, during this storage the viability of spermatozoa decreases continuously. For maintaining

viability of spermatozoa during this period, the use of optimal cryoprotectants is sometimes efficient. Trehalose is one of extracellular cryoprotectants that shows capability for stabilizing of spermatozoa membrane during cooling and freezing process, and it was expected to be a protectant agent from spermatozoa damage. The problems in this study were: How does the role of trehalose at different level in tris-based-solution minimize the decrease of spermatozoa viability during cooling and freezing? The objectives in this study were to study the role of different levels of trehalose in tris-based medium on the viability of spermatozoa in Boer goat semen after cooling and freezing. This study was designed as an experimental laboratory study. The research consisted 2 steps. While the Step 1, studied the effect of trehalose level in tris-based medium on the viability Boer goat spermatozoa after cooling. Step 2, studied the effect of trehalose level in tris-based medium on the viability Boer goat spermatozoa after freezing. As the levels of trehalose of 1.5%; 2.5% and 3.5% were applied in this research. The results of Step 1 and 2, showed that the level of trehalose statistically affected the spermatozoa viability. It was concluded, that the trehalose levels for resulting optimal spermatozoa viability after cooling and freezing were 1.5% and 2.5%, respectively. In suggestion, for the better results in the cooling and freezing of Boer goat spermatozoa, trehalose should be supplemented of 1.5% and 2.5%, respectively, in tris-based medium.

Key words: spermatozoa viability, trehalose, cooling, freezing, Boer goat

PENDAHULUAN

Dalam menunjang program IB perlu persediaan semen yang cukup secara kualitas dan kuantitas, baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku. Viabilitas spermatozoa merupakan salah satu factor yang penting dalam kualitas semen. Viabilitas spermatozoa dalam semen cair cepat menurun pada proses penyimpanan baik dengan adanya bahan pengencer maupun tanpa bahan pengencer. Namun demikian, penurunan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan dapat dihambat dengan pengenceran semen menggunakan pengencer yang mengandung komposisi yang tepat serta teknik penyimpanan yang sesuai. Penyimpanan semen dalam bentuk cair dingin memberikan alternatif aplikasi IB secara sederhana dan murah, namun

semen cair dingin (hasil pendinginan) memiliki daya tahan yang relatif pendek. Di sisi lain, penyimpanan semen dalam kondisi beku memungkinkan penggunaan semen dalam jangka waktu yang lama, tetapi pembekuan dapat mengakibatkan stress pada sel yang sering menghasilkan kerusakan membran serta penurunan motilitas dan viabilitas sperma (Barrios, Perez-Pe, Gallego, Tato, Osada, Muino-Blanco dan Cebrian-Perez, 2000; Giraud, Motta, Boucher dan Grizard, 2000).

Untuk dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa agar tetap baik selama pendinginan maupun pembekuan maka diperlukan bahan-bahan krioprotektan yang sesuai. Secara umum krioprotektan terbagi menjadi 2 golongan, yaitu: 1) *Penetrating cryoprotectants*, merupakan krioprotektan yang bisa

melalui membran sel, yang beraksi pada intraseluler dan ekstraseluler dan memiliki berat molekul rendah. Termasuk dalam kelompok ini adalah Gliserol, Dimethylsulfoxide (DMSO), Ethilene Glicol, dll. Kelompok krioprotektan kedua yaitu *Non-penetrating cryoprotectants*, merupakan krioprotektan yang tidak bisa menembus atau melalui membran sel, yang beraksi pada ekstraseluler, memiliki berat molekul tinggi. Yang termasuk dalam golongan krioprotektan ini adalah susu, kuning telur, fruktosa, laktosa, raffinosa dan trehalosa (Supriatna, 1993). Karakteristik dan konsentrasi krioprotektan sangat berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa setelah pendinginan dan pembekuan (Gilmore, Mc Gann, Liu, Gau, Peter, Kleinhans dan Crister, 1995).

Trehalosa adalah disakarida non reduksi yang tersusun atas 2 molekul glukosa. Secara alami gula ini bisa didapatkan dari berbagai organisme, misalnya bakteri, ragi, fungi, serangga, invertebrata dan pada tanaman tingkat tinggi dalam jumlah yang lebih kecil. Trehalosa dapat melindungi protein dan membran sel dari denaturasi yang disebabkan oleh berbagai kondisi stres, misalnya kondisi kering, dehidrasi, panas, dingin dan oksidasi. Di pasaran trehalosa didapatkan dari sintesa secara kimiawi (Elbein, Pan, Pastuszak dan Carrol, 2003).

Trehalosa juga dikenal sebagai “*an external membrane stabilizer*” yang mampu menstabilkan secara maksimal terhadap struktur lipid bilayer membran spermatozoa selama proses pendinginan dan pembekuan (Storey, Noiles dan Thompson 1998; Thompson, Richa, Liebbaber dan

Storey, 1998). Derajat proteksinya dipengaruhi oleh konsentrasinya di dalam pengencer (McGonagle dkk, 2002; Storey dkk., 1998; Gil dkk., 2003).

Peneliti lain melaporkan bahwa penambahan 6% gliserol dan 7,5% trehalose menghasilkan integritas membran spermatozoa mencit lebih tinggi dibandingkan dengan penggunaan raffinosa (Storey dkk., 1998). Dengan melakukan pencucian pada spermatozoa kambing, telah dilaporkan bahwa pengencer trehalosa 100% mampu menghasilkan motilitas spermatozoa, integritas akrosom dan fluiditas membran spermatozoa lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan pengencer tris-citric-acid-glucose (Aboagla dan Terada, 2003).

Trehalosa melindungi membran spermatozoa selama pendinginan dan pembekuan dengan cara membentuk ikatan hidrogen pada sisi O2 dan O3 atau O3 dan O4 dari glukosa penyusun trehalosa dengan kelompok fosfat dan karbonil dari lipid bilayer, serta membentuk ikatan hidrogen dengan asam amino penyusun protein membran spermatozoa. Dengan terbentuknya ikatan ini maka stabilitas membran spermatozoa bisa dipertahankan (Sum, Faller dan de Pablo, 2003). Selain itu trehalosa juga berperan sebagai anti oksidan yang membersihkan radikal bebas (Banaroudj, Lee dan Goldberg, 2001), sehingga stres oksidatif yang bisa menurunkan kualitas spermatozoa akan ditekan. Permasalahan yang muncul adalah Bagaimanakah peranan trehalosa pada level yang berbeda dalam pengencer dasar tris mampu menekan penurunan viabilitas spermatozoa kambing Boer selama

pendinginan dan pembekuan?. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan mengkaji pengaruh berbagai level trehalosa dalam pengencer dasar tris terhadap viabilitas spermatozoa kambing Boer setelah pendinginan dan pembekuan.

METODOLOGI PENELITIAN

Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Lapang Sumber Sekar milik Fakultas Peternakan, dan laboratorium Biologi FMIPA Unibraw Malang.

Materi Penelitian

- Pejantan kambing Boer

Sebagai penghasil semen, digunakan 6 ekor pejantan kambing Boer umur 2,0 – 2,5 tahun dengan bobot badan \pm 100 kg yang tersedia di Laboratorium Lapang Sumber Sekar Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.

- Semen

Semen yang digunakan ditampung dari pejantan kambing Boer. Hanya semen yang memiliki motilitas individu \geq 70% dengan motilitas massa \geq 2+ yang akan digunakan sebagai sampel penelitian. Frekuensi penampungan dua kali per minggu untuk setiap individu.

Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium.

Tahapan pelaksanaan penelitian:

1. Penampungan semen dengan vagina buatan khusus untuk kambing
2. Pengenceran Semen
Komposisi pengencer semen dalam 100 ml: *Tris amino methane* 1,6 g, asam

sitrat 0,9 g, Laktosa 1,4 g, Trehalosa Sesuai perlakuan (1,5%; 2,5% dan 3,5%), aquades 80 ml, kuning telur 20 ml, penisilin 0,1 g, streptomisin 0,1 g, gliserol 7 ml (khusus untuk pembekuan).

Pengenceran semen dilakukan sampai mencapai minimal 75 juta/dosis

Penelitian 1. Uji Kualitas semen setelah pendinginan

Pendinginan terhadap semua sampel penelitian yang dicobakan dilakukan setelah semen diencerkan. Evaluasi kualitas semen dilakukan pada jam ke 0, 24, dan 48 setelah pendinginan. Variabel yang diamati adalah viabilitas spermatozoa.

Penelitian 2. Uji Kualitas semen setelah pembekuan

Pembekuan semen memerlukan 2 macam pengencer, yaitu pengencer A (A-I dan A-II) dan B.

Pengencer A-I dan A-II ini merupakan stok pengencer tanpa gliserol.

Pengencer B merupakan stok pengencer yang ditambah 14% gliserol. Level gliserol yang ditambahkan adalah 14% dalam pengencer B atau 7 % dari total pengencer.

Pengencer A I sebanyak 0,1 ml diletakkan dalam tabung reaksi dan dikondisikan pada *water bath* suhu 37°C, pengencer B sebanyak 0,5 ml diletakkan dalam tabung reaksi dan disiapkan pada refrigerator suhu 3-5°C. Tahap berikutnya adalah sebanyak 0,1 ml semen dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan pengencer A-I 0,1 ml, juga dipersiapkan kebutuhan pengencer A-II 0,3 ml pada tabung reaksi yang lain berikut *thermometer*nya. Kesemuanya

diletakkan ke dalam *beaker glass* 100 ml yang telah diisi air dengan suhu 37°C dan diletakkan dalam *refrigerator* bersuhu 5°C. Pengencer A-II dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi semen dengan pengencer A-I, apabila air dalam *beaker glass* turun menjadi 12°C (biasanya membutuhkan waktu 60 menit setelah dimasukkan dalam *refrigerator*).

Pengencer B yang sudah dicampur gliserol sebanyak 0,5 ml ditambahkan secara perlahan dan penambahan dilakukan bila suhu air dalam *beaker glass* turun menjadi 3-5°C. Proses pengenceran selesai bila total volume telah terpenuhi.

Pengisian *straw* secara manual dilakukan setelah penambahan gliserol (gliserolisasi) selesai. Pengisian *straw* dilakukan di dalam *refrigerator*. *Straw* diletakkan di *beaker glass* dan disimpan kembali dalam *refrigerator* bersuhu 3-5°C, setelah pengisian seluruh *straw* selesai.

- **Ekuilibrasi** (selama 2 jam)
- **Evaluasi Kualitas Semen sebelum pembekuan**
Evaluasi kualitas semen sebelum pembekuan dilakukan terhadap viabilitas spermatozoa.
- **Pre-freezing** (suhu -140°C selama 10 menit).
- **Freezing** (suhu -196°C)
- **Thawing** (dalam air suhu 37°C selama 30 detik)
- **Evaluasi Kualitas Semen setelah pembekuan**

Evaluasi kualitas semen setelah pembekuan dilakukan terhadap viabilitas spermatozoa.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam dengan bantuan Microsof SPSS Versi 10.0 (Microsof © 2003) dan dilanjutkan uji BNT apabila hasilnya berbeda nyata atau sangat nyata. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan acak Lengkap (RAL).

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Semen Segar Kambing Boer

Sebagai materi penelitian untuk uji pendinginan dan pembekuan, semen ditampung dari 6 ekor pejantan kambing Boer.

Data hasil evaluasi semen segar dari 10 kali penampungan ditampilkan pada Tabel 1.

Hasil uji homogenitas sampel dengan menggunakan program SPSS yang telah dilakukan, kisaran data yang digunakan tergolong homogen, karena dari semua variabel yang bersifat kuantitatif yang diamati pada semen segar dengan 10 kali penampungan tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Oleh karena itu apabila terjadi perbedaan nilai pada parameter yang diamati, maka hal itu diharapkan semata-mata disebabkan oleh perlakuan yang dicobakan.

Tabel 1. Karakteristik semen segar kambing Boer (n = 10)

Parameter	Rata-rata ± SD
Warna	Putih Keruh
Konsistensi	Agak Kental
PH	7,00 ± 0,0
Volume (ml)	0,81 ± 0,33
Konsentrasi (juta)	3387 ± 230,32
Motilitas Massa	2+ - 3+
Motilitas Individu (%)	74,50 ± 3,69
Viabilitas (%)	88,03 ± 3,07
Abnormal (%)	6,87 ± 1,98
Integritas Membran (%)	72,67 ± 3,66

Viabilitas spermatozoa setelah pendinginan

Untuk mengetahui viabilitas spermatozoa dilakukan dengan pengamatan terhadap preparat semen yang terlebih dahulu dilakukan pewarnaan dengan menggunakan eosin negrosin. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400X. Persentase viabilitas spermatozoa dihitung dari membagi antara jumlah spermatozoa hidup dengan total spermatozoa yang diamati (hidup dan mati) dikalikan 100%. Spermatozoa hidup ditandai dengan kondisi kepala spermatozoa yang transparan, sedangkan spermatozoa mati ditandai dengan kepala spermatozoa yang berwarna merah muda karena telah menyerap

pewarna di sekelilingnya (membran telah rusak sehingga permeabilitas meningkat).

Viabilitas spermatozoa kambing Boer setelah pendinginan pada level trehalosa yang berbeda ditampilkan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa baik pada pengamatan jam ke 0, ke 24 maupun ke 48 setelah pendinginan level trehalosa berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas spermatozoa. Level trehalosa 1,5% menghasilkan viabilitas spermatozoa tertinggi, diikuti dengan level 2,5% dan 3,5 %. Hasil uji BNT menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa pada level trehalosa 1,5% dan 2,5 % tidak menunjukkan perbedaan, sedangkan viabilitas

spermatozoa pada level trehalosa 3,5% adalah berbeda sangat nyata dengan

level trehalosa 1,5% dan 2,5%.

Tabel 2. Viabilitas Spermatozoa (%) Kambing Boer Setelah Pendinginan pada Level Trehalosa yang Berbeda

Pengamatan Jam ke:	Level Trehalosa (%)	Rata-rata \pm SD
0	1,5	77,56 \pm 5,12 ^b
	2,5	76,72 \pm 5,33 ^b
	3,5	69,15 \pm 4,99 ^a
24	1,5	68,60 \pm 5,03 ^b
	2,5	65,41 \pm 5,43 ^b
	3,5	57,82 \pm 7,51 ^a
48	1,5	60,93 \pm 6,51 ^b
	2,5	59,43 \pm 7,91 ^b
	3,5	50,96 \pm 7,47 ^a

Notasi a,b,c, pada kolom yang sama berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

Viabilitas spermatozoa kambing sebelum dan setelah pembekuan pada level trehalosa yang berbeda ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. menunjukkan bahwa level trehalosa berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas spermatozoa sebelum pembekuan dan berbeda nyata pada pengamatan setelah pembekuan ($P < 0,05$). Pada pengamatan sebelum pembekuan, level trehalosa 2,5% menghasilkan viabilitas spermatozoa tertinggi, diikuti dengan level 1,5% dan terakhir 3,5%, sedangkan setelah pembekuan level trehalosa 2,5% menghasilkan viabilitas spermatozoa tertinggi setelah pembekuan dan level trehalosa 3,5% menghasilkan viabilitas spermatozoa terendah. Hasil uji BNT sebelum pembekuan menunjukkan bahwa masing-masing level trehalose

menunjukkan adanya perbedaan, sedangkan setelah pembekuan level 1,5% tidak berbeda dengan level 2,5% dan level 3,5%, sedangkan level 3,5% berbeda dengan level 2,5%.

Level trehalosa berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa setelah pendinginan maupun pembekuan. Level trehalosa 1,5% adalah level optimal untuk pendinginan, sedangkan level 2,5% adalah level optimal untuk pembekuan (Tabel 2. dan 3.). Level trehalosa yang optimal diperlukan untuk mendukung stabilisasi membran sel dan keseimbangan osmolaritas yang sesuai antara intra dan ekstraseluler.

Tabel 3. Viabilitas Spermatozoa (%) Kambing Boer Sebelum dan Setelah Pembekuan pada Level Trehalosa yang Berbeda

Level Trehalosa (%)	Sebelum Pembekuan Rata-rata \pm SD (%)	Setelah Pembekuan Rata-rata \pm SD(%)
1,5	69,47 \pm 3,37 ^b	49,88 \pm 7,92 ^{pq}
2,5	74,88 \pm 5,20 ^c	52,22 \pm 10,83 ^q
3,5	64,11 \pm 7,80 ^a	41,93 \pm 9,10 ^p

Notasi a,b,c pada kolom yang sama berbeda sangat nyata ($P < 0,01$)

Notasi p,q pada kolom yang sama berbeda nyata ($P < 0,05$)

Level optimum trehalosa untuk pembekuan lebih tinggi dari pendinginan (2,5% vs 1,5%), karena proses pembekuan menyebabkan tingkat perubahan polaritas yang lebih besar jika dibandingkan dengan pendinginan. Kondisi ini akan memberikan peluang yang lebih besar terhadap trehalosa untuk berikatan dengan gugus karbonil lipid membran, sehingga level trehalosa yang dibutuhkan lebih banyak.

Destabilisasi membran yang terjadi akibat tidak optimalnya level krioprotektan akan berakibat meningkatkan jumlah kematian sel. Menurut Fuller dan Shields (1998); Anzar, He, Buhr dan Kroetsch (2002) ada beberapa hal yang menyebabkan kematian sel sehubungan dengan destabilisasi membran, diantaranya adalah:

1. Aksi dari Ca^{2+}

Ion kalsium memiliki peran penting dalam mengawali kematian sel. Meningkatnya konsentrasi kalsium bebas dalam sel akan menyebabkan kematian sel, karena keberadaan kalsium bebas ini akan mengaktifkan enzim-enzim penyebab kematian sel, enzim-enzim tersebut diantaranya adalah:

- a. endonuclease, yang akan menghancurkan DNA dalam inti spermatozoa
- b. transglutaminase, yang berikatan secara kovalen dengan protein membran melalui pembentukan ikatan isopeptida yang mematikan sel.

2. Adanya perubahan susunan membran

Membran spermatozoa tersusun atas lipid (fosfolipid), kolesterol dan protein. Perubahan susunan fosfolipid penyusun membran (karena terjadinya translokasi fosfatidil serin dari lembaran dalam membran menuju ke lembaran luar membran, hal ini terjadi karena cekaman dingin atau beku, juga akan menyebabkan kematian sel spermatozoa (Fuller and Shields, 1998). Namun di sisi lain, selama pendinginan terjadi interaksi daerah hidrofobik sehingga sebagian besar partikel membran dari lembaran luar menempel pada lembaran dalam, sehingga pada lembaran luar hanya sedikit partikel yang tersisa. Hal ini akan menyebabkan destabilisasi membran yang akan mengakibatkan penurunan fungsi fisiologi membran (Fuller dan Shields, 1998). Trehalosa terutama berperan dalam

mempertahankan stabilitas struktur membran spermatozoa. Trehalose akan menstabilkan membran dengan jalan membentuk ikatan hidrogen pada sisi O2 dan O3 atau pada O3 dan O4 pada glukosa penyusun trehalosa dengan kelompok fosfat atau karbonil pada membran bilayer. Disamping itu juga membentuk jembatan yang menghubungkan antara fosfolipid satu dengan yang lain. Terhadap protein membran, trehalosa menstabilkan membran dengan cara membentuk ikatan hidrogen antar asam amino penyusun protein. Interaksi yang terbentuk ini akan mencegah denaturasi dan agregasi protein yang menurunkan fungsi protein. Apabila terjadi akumulasi denaturasi protein membran maka akan menyebabkan kematian spermatozoa. Hal ini karena protein membran yang seharusnya memiliki fungsi fisiologis sel (misalnya sebagai enzim, komunikasi sel, kanal membran) akan mengalami kehilangan fungsi, sehingga fisiologi sel tidak bisa berjalan sebagaimana mestinya (Chen, Bekar, Xu, Fan dan Hadad, 2003). Sedangkan menurut Widodo (2003) proses kematian sel bisa diawali di mitokondria dengan diaktifkannya suatu mega kanal (suatu perubahan konformasional) yang terjadi pada bagian dalam dan luar sehingga matrik mitokondria berhubungan langsung dengan sitoplasma melalui *Mitochondrial Transition Pore* (MTP).

Mitochondrial Transition Pore adalah poros yang tidak selektif dengan konduktan yang tinggi. Pada poros itu sendiri didapatkan berbagai enzim seluler yang penting, seperti: hexokinase, creatine kinase dan molekul transporter, seperti: adenine nucleotide translocator (Benardi, 1996).

Mitochondrial Transition Pore juga berperan pada pelepasan ion kalsium (Benardi and Petrolini, 1996).

Terbukanya MTP oleh berbagai sebab akan menyebabkan dikeluarkannya isi matrik mitokondria, seperti: ion kalsium, substrat metabolik yang penting, dan anti oksidan serta ATP. Kehilangan anti oksidan (GSH) ini menyebabkan mitokondria tidak viable oleh karena GSH sangat dibutuhkan untuk reduksi H₂O₂ dan Reaksi Oksigen Spesies (ROS) yang lain.

Pengencer semen yang tidak mengandung antioksidan akan menyebabkan peningkatan stres oksidatif dalam sel dan tingginya ion kalsium dalam matriks mitokondria yang dapat menyebabkan terbukanya MTP, yang akan menyebabkan keluarnya berbagai komponen membran potensial mitokondria. Selanjutnya akan dikeluarkan faktor apoptosis, seperti *cytochrom C* (*Cyt C*) dan AIF. Faktor proapoptosis ini akan mengaktifasi *cascade caspase*, yang bersama dengan hilangnya enzim yang memperbaiki kerusakan DNA dan aktivasi *endonuklease* akan menyebabkan fragmentasi (hancurnya) DNA dan kematian sel.

Trehalosa dalam hal ini bertindak sebagai antioksidan dalam proses pendinginan dan pembekuan spermatozoa. Penambahan trehalosa ke dalam medium akan meningkatkan resistensi sel terhadap radikal bebas (H₂O₂) yang merupakan hasil samping dari mitokondria dalam memproduksi ATP. Radikal bebas dalam konsentrasi tinggi akan menyebabkan stres oksidatif sel yang diindikasikan dengan rusaknya ikatan kovalen antar asam amino penyusun protein membran.

Kerusakan ikatan kovalen ini akan berakibat pada agregasi (penggumpalan) dan denaturasi (perubahan sifat) protein atau kemunduran fungsi protein. Pada lipid membran cekaman dingin atau beku akan memicu terjadinya oksidasi pada ikatan rangkap asam lemak tak jenuh yang akan berakibat terhadap peroksidasi lipid membran. Apabila hal ini terjadi maka struktur lipid membran akan berubah dan fungsi lipid membran akan mengalami perubahan pula. Keberadaan trehalosa di dalam pengencer akan mengeliminir terjadinya ikatan radikal bebas terhadap asam amino penyusun protein atau lipid membran (karena radikal bebas akan diikat oleh trehalosa), sehingga kerusakan protein atau lipid membran dapat dicegah (Banaroudj dkk. 2001; Chen, dkk. 2003).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dalam pendinginan dan pembekuan semen kambing Boer, masing-masing penambahan level trehalosa 1,5% dan 2,5% dalam pengencer dasar tris menghasilkan semen dengan viabilitas optimal.

Saran

Dalam pendinginan dan pembekuan semen kambing Boer sebaiknya ditambahkan trehalosa masing-masing 1,5% dan 2,5% dalam pengencer dasar tris agar mendapatkan viabilitas spermatozoa yang optimal

DAFTAR PUSTAKA

Aboagla, E.M.E. and T. Terada. 2003. Trehalose-Enhanced Fluidity of

the Goat Sperm Membrane and Its Protection During Freezing. *J. Biol. Reprod.*

Anzar, M., He, L., M.M. Buhr, T.G. Kroetsch and K.P. Pauls. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility., *J. Biol. Reprod.* 66, 354-360.

Banaroudj, N., D.H. Lee and A.L. Goldberg. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 276: 24261-24267.

Barrios, B, R. Perez-Pe, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muino-Blanco, A. Cebrian-Perez. 2000. Seminal plasma protein revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Bio Reprod* 63, 1531-1537.

Benardi, P. 1996. Permeability transition pore. Control point of a Ca sensitive mitochondrial channel involved in cell death. *Biochem. Biomebr.* 28: 131-138.

Chent, Q., K.L. Behar, T. Xu, C. Fan and G.G. Haddad. 2003. Expression of Drosophila Trehalose-Phosphate Synthase in HEK-293 Cells Increases Hypoxia Tolerance. *J. Biol. Chemistry.* 49113-49118.

Elbein, A.D., Y.T. Pan, I. Pastuszak and D. Carroll. 2003. New Insights on Trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology.* 13 (4): 17R-27R.

Fuller, G. M. dan D. Shields. 1998. *Molecular Basis of Medical Cell Biology.* Prentice Hall International, Inc. USA.

- Gil, J. N. Lundeheim, L. Soederquist and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, 59(5-6), 1241-1255.
- Gilmore, J. A., J. Du, J. Tao, A.T. Peter, and J.K. Critser., 1996. Osmotic Properties of Boar Spermatozoa and Their Relevance to Cryopreservation. *J. reprod. Fertil.* 996 (107): 87-95.
- Giraud, M.N., C. Motta, D. Boucher, G. Grizard. 2000. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservartion of human spermatozoa. *Hum Repr.* 5(10) : 2160 – 2164.
- McGonagle, L.S, M. Goldstein, J. Feldschuh, R.H. Foote. 2002. The influence of cryoprotectrive and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J Androl* 4: 137-141.
- 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. *J. Cryobiology* 37: 46-58.
- Sum, A.K., R. Faller and J.J. de Pablo. 2003. Molecular Simulation Study of Phospholipid Bilayers and Insights of The Interactions with Disaccharides. *J. Biophiys.* 85: 2830-2844.
- Supriatna, I. 1993. Metode-metode Dasar Pembekuan Embrio Mammalia. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.Bogor.
- Thompson, K. A., J. Richa, S. A. Liebhaber and B. T. Storey. 1998. Dialysis Addition of Trehalose/Glycerol Cryoprotectant Allows Recovery of Cryopreserved Mouse Spermatozoa With Satisfactory Fertilizing Ability as Assessed by Yield of Live Young. *J. Androl.* 22 (2) : 339-344.
- Widodo, M. A. 2003. Calsium dan Generasi Spesies Oksigen Reaktif Pada Fungsi Mitokondria. Buku Kumpulan Makalah. Basic Molecular Biology Course on Mitochondrial Medicine. Fakultas Kedokteran Unibraw. Malang.