

Pengaruh Penambahan Trehalosa dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*)

Herdis¹⁾, Maman Surachman¹⁾, Muhammad Rizal²⁾, Arief Boediono³⁾ dan Yulnawati⁴⁾

¹⁾Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Gedung BPPT II Lantai 16
Jl. MH. Thamrin 8 Jakarta 10340

²⁾Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura
Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka, Ambon

³⁾Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB

⁴⁾Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi LIPI, Cibinong

Diterima Mei 2005 disetujui untuk diterbitkan Januari 2006

Abstract

This study was aimed to examine the quality of chilled-cement of Garut ram which was diluted with Tris extender and various trehalose concentrations. Cement was collected from three mature rams using an artificial vagina once a week. After initial evaluation, the cement was divided into four parts and diluted with Tris extender only (control), Tris extender + 0.20% (TR0.2), Tris extender + 0.40% (TR0.4), and Tris extender + 0.60% (TR0.6) trehalosa respectively. The extended-cement was stored at 5°C. Parameters of chilled-cement quality examined were percentage of sperm motility, live sperm, and intact plasma membrane (IPM), which were evaluated every day for four days. The results showed that addition of trehalose did not significantly improved the percentage of sperm motility, live sperm, and IPM ($P>0.05$) of Garut ram sperm stored in refrigerator at 5°C for 4 days. In conclusion, the addition of trehalose does not enhance the quality of chilled-cement of Garut ram.

Key words: *Trehalose, Tris extender, chilled-cement, Garut ram*

Pendahuluan

Domba garut merupakan salah satu domba tropik yang prolifk dan memiliki berat badan yang relatif lebih besar bila dibandingkan dengan domba lokal Indonesia lainnya. Domba jantan dewasa memiliki berat badan sekitar 60 hingga 80 kg, bahkan dapat mencapai lebih dari 100 kg, sedangkan domba betina dewasa memiliki berat badan sekitar 30 hingga 50 kg. Dengan demikian, domba garut memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan menjadi suatu peternakan yang modern, produktif, dan efisien (Herdis, 2005). Domba jantan dapat juga dijadikan sebagai donor semen dengan tujuan untuk memperbaiki penampilan domba lokal lainnya melalui pendekatan teknologi reproduksi.

Aplikasi teknologi inseminasi buatan (IB) pada ternak domba dalam upaya untuk meningkatkan produktivitas, perbaikan mutu genetik, dan efisiensi hingga saat ini belum memberikan hasil sesuai dengan yang diharapkan. Rendahnya keberhasilan IB pada domba disebabkan oleh kesulitan dalam mendeposisikan semen dan rendahnya kualitas semen yang digunakan.

Penyediaan semen berkualitas baik merupakan salah satu syarat mutlak dalam upaya meningkatkan keberhasilan IB. Guna mempertahankan daya hidup spermatozoa dalam waktu lama biasanya semen disimpan pada suhu yang rendah. Penyimpanan semen pada suhu rendah yang telah lazim dilakukan adalah pada suhu sekitar 3 hingga 5°C (di dalam

refrigerator) dan pada suhu -196°C dalam keadaan beku (di dalam konteiner nitrogen cair). Namun, penyimpanan semen pada suhu rendah dapat mengakibatkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas semen. Kerusakan spermatozoa pada umumnya dimulai pada membran plasma sel yang disebabkan oleh pengaruh *cold shock* (kejut dingin). Rusaknya membran plasma sel akan berpengaruh buruk terhadap kelangsungan hidup sel secara keseluruhan.

Upaya menekan terjadinya kerusakan spermatozoa yang disimpan dalam waktu lama pada suhu rendah dapat dilakukan dengan menambahkan berbagai senyawa di dalam pengencer semen. Salah satu senyawa yang dapat digunakan untuk keperluan tersebut adalah gula. Trehalosa merupakan salah satu jenis gula yang telah terbukti dapat memperbaiki kualitas semen berbagai jenis hewan ternak (Rizal *et al.*, 2003).

Aisen *et al.* (2000, 2002) melaporkan bahwa penambahan trehalosa di dalam pengencer mampu memperbaiki kualitas semen beku domba pampinta. Demikian pula, dilaporkan bahwa penambahan trehalosa di dalam pengencer dapat memperbaiki kualitas semen beku sapi (Woelders *et al.*, 1997), semen beku mencit (Storey *et al.*, 1998), semen beku anjing (Yildiz *et al.*, 2000), dan semen beku kambing (Aboagla dan Terada, 2003).

Pada penelitian ini berbagai konsentrasi trehalosa ditambahkan ke dalam pengencer semen dengan maksud untuk menekan terjadinya kerusakan spermatozoa domba Garut yang disimpan pada suhu 5°C .

Materi dan Metode

Sebagai sumber semen yang diuji kualitasnya, digunakan enam ekor pejantan domba Garut matang kelamin berumur sekitar 3 tahun dengan berat badan rata-rata 83 kg (berkisar antara 70 dan 98 kg) dan memiliki kondisi kesehatan tubuh yang baik. Setiap domba dikandangkan secara individu dan diberi pakan berupa rumput dan leguminosa segar sekitar 7 hingga 9 kg serta ampas tahu atau tempe sebanyak 0,20 kg per ekor per hari. Guna menjaga kesehatannya, pejantan dimandikan sekali setiap minggu.

Semen ditampung menggunakan vagina buatan satu kali dalam satu minggu. Segera setelah ditampung, semen dinilai secara makroskopis dan mikroskopis. Penilaian makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi (kekentalan), dan derajat keasaman (pH) semen, sedangkan penilaian mikroskopis meliputi gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas, spermatozoa hidup, abnormalitas, dan membran plasma utuh (MPU). Semen segar yang memenuhi syarat (persentase motilitas $\geq 70\%$, konsentrasi ≥ 2000 juta sel per mL, gerakan massa ++ atau +++, dan abnormalitas $< 15\%$) diencerkan sesuai dengan perlakuan yang dicobakan.

Semen diencerkan dengan pengencer Tris yang terdiri atas 2,42 g Tris(hidroksimetil)aminometana, 1,28 g asam sitrat, 2.16 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Kemudian, ditambahkan antibiotika penisilin 1.000 IU/mL dan streptomisin 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Jumlah pengencer yang digunakan ditentukan berdasarkan atas persamaan yang dikemukakan oleh Toelihere (1993) sebagai berikut.

$$\text{Jumlah pengencer} = \frac{\text{volume semen} \times \text{motilitas} \times \text{konsentrasi}}{100 \times 10^6} \times 0,2 - \text{volume semen}$$

Guna mengetahui pengaruh trehalosa terhadap kualitas semen cair domba Garut dicoba empat perlakuan dosis trehalosa dengan jumlah penampungan semen sebanyak enam kali sebagai ulangan. Keempat perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap tersebut adalah

- 80% pengencer Tris + 20% kuning telur (kontrol)
- 80% pengencer Tris + 20% kuning telur + 0,20% trehalosa (TR0.2)
- 80% pengencer Tris + 20% kuning telur + 0,40% trehalosa (TR0.4)
- 80% pengencer Tris + 20% kuning telur + 0,60% trehalosa (TR0.6)

Masing-masing perlakuan dimasukkan ke dalam gelas tabung reaksi berukuran 10 mL dan ditutup rapat. Tabung reaksi yang berisi semen sebanyak 1,50 mL yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam gelas piala berisi air dan disimpan di dalam lemari es. Setiap hari selama empat hari sampel semen pada masing-masing perlakuan dievaluasi kualitasnya, yang meliputi persentase motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU.

Persentase motilitas adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan), ditentukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Angka yang diberikan berkisar dari 0% hingga 100% dengan skala 5% (Toelihere, 1993).

Persentase spermatozoa hidup ditentukan menggunakan pewarnaan eosin (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang berwarna putih, sedangkan yang spermatozoa mati ditandai oleh kepala yang berwarna merah. Sekurang-kurangnya sebanyak 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Persentase MPU adalah persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh, ditentukan menggunakan metode *osmotic resistance test* (Revell dan Mrode, 1994). Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor yang melingkar atau menggembung, sedangkan spermatozoa yang rusak ditandai oleh ekor yang lurus apabila semen dipaparkan di dalam larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Sekurang-kurangnya sebanyak 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400x.

Data dianalisis dengan analisis ragam. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

Hasil dan Pembahasan

Evaluasi terhadap kuantitas dan kualitas semen segar dimaksudkan untuk mengetahui kadar pengenceran yang dibutuhkan serta untuk menentukan layak tidaknya semen tersebut untuk diproses lebih lanjut. Kuantitas dan kualitas semen yang diperoleh menunjukkan karakteristik semen segar domba Garut (Tabel 1).

Hasil yang diperoleh kurang lebih sama dengan yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Volume semen segar domba Garut rata-rata 0,84 mL (Yulnawati, 2002), 0,86 mL (Farhan, 2003), dan 0,97 mL (Kristanto, 2004). Persentase motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU semen segar domba Garut masing-masing 74,17%, 83,00%, dan 85,50% (Yulnawati, 2002), 78,64%, 83,18%, dan 81,00% (Farhan, 2003), serta 75,00%, 84,80%, dan 81,20% (Kristanto, 2004). Hasil penelitian Rizal *et al.* (2003) menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas dan MPU semen segar domba Garut masing-masing sebesar 76,67% dan 87,33%. Sementara itu, menurut Inounu *et al.* (2001) volume semen domba Garut adalah 0,76 mL (kisaran 0.3 hingga 2 ml) dengan warna bening hingga krem, konsistensi encer hingga kental, gerakan massa rata-rata 2,81 (kisaran 1 hingga 4), rata-rata persentase motilitas 58,08% (kisaran 10 hingga 80%), rata-rata persentase spermatozoa hidup 64,32% (kisaran 19 hingga 95%), dan rata-rata konsentrasi 2490,60 juta spermatozoa/mL (kisaran 950 hingga 4080 juta spermatozoa/mL). Hasil penelitian Feradis (1999) pada domba *st. croix* menunjukkan bahwa rata-rata volume semen 1.66 mL, pH 6,8, konsentrasi 3785 juta spermatozoa/mL, motilitas 81,67%, spermatozoa hidup 89,33%, abnormalitas 8,33%, dan MPU 86,33%.

Tabel 1. Karakteristik semen segar domba Garut
Table 1. Characteristic of Garut ram fresh sperm

Parameter	Ukuran
Volume (mL)	0,90 ± 0,09
Warna	krem
Derajat keasaman (pH)	6,95 ± 0,12
Konsistensi (kekentalan)	kental
Gerakan massa	+++
Konsentrasi ($\times 10^6$ /mL)	4281 ± 327
Motilitas (%)	75,00 ± 2,04
Spermatozoa hidup (%)	86,83 ± 2,32
Abnormalitas (%)	2,80 ± 1,10
Membran plasma utuh, MPU (%)	84,67 ± 1,03

Berdasarkan atas nilai karakteristik semen yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa semen segar domba percobaan memiliki kualitas yang baik sehingga layak untuk diproses lebih lanjut, baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku.

Tabel 2. Rata-rata persentase motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU domba Garut selama empat hari penyimpanan pada suhu 5°C

Table 2. The average of sperm motility, live sperms, and intact sperm membranes of Garut ram stored at 5°C for 4 days

Peubah	Perlakuan	Penyimpanan hari ke-			
		1	2	3	4
Motilitas (%)	Kontrol	75,00 ± 0,00	62,50 ± 3,54	50,00 ± 5,00	43,33 ± 2,89
	TR0.2	75,00 ± 0,00	65,00 ± 5,48	61,00 ± 4,18	48,00 ± 4,47
	TR0.4	75,00 ± 0,00	66,00 ± 4,18	59,00 ± 4,18	50,00 ± 4,08
	TR0.6	75,00 ± 0,00	65,00 ± 3,16	57,50 ± 4,18	47,00 ± 5,70
Spermatozoa hidup (%)	Kontrol	80,40 ± 2,07	77,67 ± 4,04	69,75 ± 4,57	59,67 ± 5,13
	TR0.2	81,40 ± 2,51	79,00 ± 4,94	73,67 ± 4,84	62,83 ± 3,06
	TR0.4	80,20 ± 1,64	78,40 ± 5,50	71,40 ± 5,46	62,40 ± 7,20
	TR0.6	82,20 ± 0,45	78,83 ± 4,07	74,60 ± 2,70	61,40 ± 6,11
MPU (%)	Kontrol	81,20 ± 2,17	78,25 ± 2,87	71,25 ± 5,74	64,00 ± 5,00
	TR0.2	80,60 ± 1,34	79,50 ± 2,26	73,33 ± 4,23	66,80 ± 3,78
	TR0.4	79,80 ± 0,84	78,40 ± 2,51	73,80 ± 4,32	67,00 ± 7,16
	TR0.6	79,60 ± 1,67	79,33 ± 2,24	71,33 ± 3,50	65,00 ± 3,67

Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa penambahan trehalosa di dalam pengencer Tris secara statistik tidak nyata meningkatkan persentase motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU selama empat hari penyimpanan di dalam lemari es pada suhu 5°C. Walaupun demikian, terdapat kecenderungan bahwa penambahan trehalosa mampu meningkatkan nilai seluruh peubah kualitas spermatozoa yang diamati selama penyimpanan (Tabel 2). Sebagai contoh, pada hari keempat penyimpanan, persentase motilitas spermatozoa semen yang ditambah 0,4% trehalosa (50%) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kontrol (43,33%). Peningkatan persentase motilitas spermatozoa sebesar 6,67% ini cukup berarti karena di dalam semen terkandung ratusan juta spermatozoa.

Terjadinya peningkatan kualitas spermatozoa ini karena trehalosa dapat berperan sebagai substrat sumber energi dan sebagai krioprotektan ekstraseluler. Sebagai substrat sumber energi, setelah diuraikan menjadi monosakarida, trehalosa dapat dimetabolisasi melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam sitrat (siklus Krebs) sehingga dihasilkan energi berupa adenosin trifosfat (ATP) yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam proses pergerakan (motilitas). Sebagai krioprotektan ekstraseluler, trehalosa akan melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan secara mekanis yang mungkin terjadi selama penyimpanan semen akibat pengaruh suhu yang rendah.

Gula dapat melindungi membran plasma sel spermatozoa karena pada bagian luar membran plasma sel terdapat karbohidrat yang berikatan dengan lipida (glikolipida) atau dengan protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks (Subowo, 1995). Diasumsikan bahwa trehalosa yang ditambahkan ke dalam pengencer akan berasosiasi dengan karbohidrat tersebut sehingga membran plasma terlindungi dari kerusakan selama penyimpanan semen pada suhu rendah. Kalaupun karbohidrat yang ada pada membran plasma sel tersebut rusak selama penyimpanan semen, diharapkan trehalosa yang ditambahkan dapat menjadi pengganti sehingga struktur selubung sel tetap utuh.

Perlindungan membran plasma dari kerusakan akan memberikan pengaruh positif terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hal ini karena motilitas sperma sangat bergantung kepada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme sendiri akan berlangsung dengan baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk keluarnya semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme ke dan dari dalam sel. Hal ini terjadi karena pada membran plasma sel terdapat banyak makromolekul seperti protein, lipoprotein, dan glikoprotein, yang dapat berfungsi sebagai enzim, reseptor, saluran, atau pembawa (*carrier*). Makromolekul-makromolekul inilah yang memfasilitasi lalu lintas masuk dan keluarnya seluruh substrat dan elektrolit tersebut ke dan dari dalam sel. Substrat dan elektrolit harus difasilitasi karena mereka tidak dapat menembus membran plasma sel spermatozoa yang bersifat semipermeabel secara difusi bebas. Selain itu, membran plasma juga berfungsi sebagai pelindung bagi organel-organel yang terdapat di dalam sel dari kerusakan secara mekanis.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Penambahan gula berupa 60 mM (2,16%) laktosa (Rizal *et al.*, 2003) dan 1,20% maltosa (Herdis, 2005) secara nyata meningkatkan kualitas semen yang disimpan pada suhu 5°C dan kualitas semen beku domba Garut. Aisen *et al.* (2000, 2002) melaporkan bahwa penambahan trehalosa di dalam pengencer mampu memperbaiki kualitas semen beku domba pampinta. Demikian pula, dilaporkan bahwa penambahan trehalosa di dalam pengencer dapat memperbaiki kualitas semen beku sapi (Woelders *et al.*, 1997), semen beku mencit (Storey *et al.*, 1998), semen beku anjing (Yildiz *et al.*, 2000), dan semen beku kambing (Aboagla dan Terada, 2003). Perbedaan antara hasil penelitian ini dan yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya mengindikasikan bahwa trehalosa akan berfungsi secara optimal sebagai krioprotektan ekstraseluler dalam proses kriopreservasi (pembekuan) semen, tetapi bukan dalam proses penyimpanan semen pada suhu 5°C.

Kesimpulan

Penambahan trehalosa hingga 0,6% di dalam pengencer Tris secara statistik belum mampu memperbaiki kualitas spermatozoa domba Garut yang disimpan pada suhu 5°C selama empat hari.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BPPT), Jakarta dan Peternakan Domba Laga "Lesan Putra" PT Sarbi Moerhani Lestari, Ciomas, Bogor atas dukungan dana, hewan percobaan, dan fasilitas pendukung lainnya sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

Daftar Pustaka

- Aboagla, E.M.E. and T. Terada. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod. In Press.*
- Aisen, E.G., H.L. Alvarez, A. Venturino, and J.J. Garde. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.
- Aisen, E.G., V.H. Medina, and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen semen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57:1801-1808.
- Farhan. 2003. Kajian Nira sebagai Pengencer Alternatif Semen Domba Garut. Skripsi. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus pada Program Inseminasi Buatan Domba St. Croix. Disertasi. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Herdis. 2005. Optimalisasi Inseminasi Buatan Melalui Aplikasi Teknologi Laserpunktur pada Domba Garut (*Ovis aries*). Disertasi. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Inounu, I., N. Hidajati, S.N. Jarmani, D. Priyanto, Hastono, B. Setiadi, dan Subandriyo. 2001. Pengaruh interaksi genetik dan lingkungan terhadap produksi domba persilangan dan domba lokal pada beberapa lokasi pengamatan: evaluasi kualitas semen domba hasil persilangan. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Bagian "Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan/ARMP II". Puslitbang Peternakan. Hlm 64-73.
- Kristanto, T. 2004. Peranan Gliserol dan Fetal Bovine Serum dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara, dan P. Situmorang. 2003. Kriopreservasi semen domba garut dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan* 19:79-83.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Storey, B.T., E.E. Noiles, and K.A. Thompson. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37:46-58.

Subowo. 1995. *Biologi Sel*. Angkasa, Bandung.

Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa, Bandung.

Woelders, H., A. Matthij, and B. Engel. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35:93-105.

Yildiz, C., A. Kaya, M. Aksoy, and T. Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54:579-585.

Yulnawati. 2002. *Pemanfaatan Sari Buah Melon dan Sari Wortel sebagai Pengencer Alternatif Semen Domba Garut*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.