

# SPERM MEMBRANE INTEGRITY OF PE CROSSBRED GOAT SEMEN FOLLOWING SUPPLEMENTATION OF ONION EXTRACT IN EXTENDER DURING COLD STORAGE

Suyadi<sup>1</sup>, Sri Wahjuningsih<sup>1</sup> and Putut Bayu Wara<sup>2</sup>

1) Lecturer of Animal Husbandry Faculty, Brawijaya University

2) Student of Animal Husbandry Faculty, Brawijaya University

Jl. Veteran, Malang, Indonesia 65145, e-mail: [suyadi@ub.ac.id](mailto:suyadi@ub.ac.id)  
[putut.bayu@gmail.com](mailto:putut.bayu@gmail.com)

## ABSTRACT

This research was to evaluate the effect of red onion (*Allium cepa*) extract supplementation in *AndroMed*<sup>®</sup> extender on the sperm membrane integrity of PE crossbred goat semen. Methods used in this research was completely nested randomized design. The onion extract was supplemented to *AndroMed*<sup>®</sup> extender with the level of 0,0 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 percent (V/V) or 0: 100, 1,0: 99, 2,0:98, 3,0:97 ml for onion extract and *AndroMed*<sup>®</sup> extender, respectively. Sperm membrane integrity was evaluate at 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> hour after dilution. The result showed that 2,0% red onion extract supplementation to *AndroMed*<sup>®</sup> extender influenced significant ( $P < 0,01$ ) effect on the sperm membrane integrity of PE crossbred goat semen during cold storage. Membrane integrity value was  $85,81 \pm 1,47$  at 1<sup>st</sup> hour,  $76,67 \pm 1,40\%$  at 2<sup>nd</sup> hour and  $67,04 \pm 2,12\%$  at 3<sup>rd</sup> hour. This conclude that the supplementation of 2,0% red onion extract gave the best result to mantain membran integrity of PE crossbred goat semen until 3 hour storage and could be used for artificial insemination properly.

*Keywords: onion extracts, semen, AndroMed*<sup>®</sup>, *antioksidan, cold temperature.*

## PENDAHULUAN

Kambing PE merupakan salah satu komoditas ternak yang cukup potensial untuk dikembangkan. Ternak ini telah banyak dikembangkan di beberapa daerah di Indonesia. Kambing PE dikenal sebagai ternak dwiguna. Menurut Sugito (2004) kambing PE memiliki banyak manfaat, antara lain: sebagai penghasil susu, penghasil daging, anak untuk bibit, feses sebagai bahan pupuk tanaman pertanian dan juga sebagai penghasil uang tunai. Hal ini menjadi daya tarik bagi para peternak untuk mengembangkan kambing PE tersebut.

Dalam rangka mendukung pengembangan kambing PE tersebut dapat dilakukan dengan cara menyediakan dan menyebarkan bibit-bibit unggul kambing PE dalam negeri. Salah satu cara paling praktis dan sudah banyak dikenal luas oleh masyarakat adalah teknologi Inseminasi Buatan (IB). Teknik IB merupakan teknologi reproduksi yang relatif lebih mudah diaplikasikan dibandingkan dengan teknologi reproduksi lainnya. Keberhasilan teknik (IB) sangat dipengaruhi oleh kualitas dari semen pejantan yang akan digunakan. Program IB akan berhasil dengan baik apabila

semen dapat diproduksi dalam jumlah dan kualitas yang baik (Toelihere, 1993).

Kualitas semen dapat dipertahankan jika tidak terjadi kerusakan terhadap integritas membran semen tersebut. Upaya menjaga integritas membran semen kambing dapat dilakukan dengan memberikan suasana nyaman terhadap semen selama proses penyimpanan. Menurut Yulnawati dan Setiadi (2005) semen ejakulat dapat disimpan selama 4 hari pada suhu 4<sup>0</sup>C, namun semen yang disimpan pada suhu rendah (umumnya pada suhu 3-5<sup>0</sup>C) memiliki permasalahan yakni terjadinya suatu proses yang disebut kejutan dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membran plasma sel dan berakibat kematian spermatozoa. Di sisi lain, kerusakan integritas membran spermatozoa juga dikarenakan oleh aktivitas metabolisme sel spermatozoa itu sendiri yang menghasilkan radikal bebas dan sangat reaktif terhadap sel-sel dengan kandungan fosfolipid tinggi di dalam membran sel. Hal ini karena fosfolipid utamanya membran lipid bilayer sangat reaktif jika terkena oksigen sehingga mudah teroksidasi ketika terkena radikal bebas. Diantara radikal bebas yang ada, terdapat satu spesies radikal bebas yang sangat merusak terhadap integritas membran sel spermatozoa yaitu *Reactive Oxygen Species (ROS)*, sehingga diperlukan upaya untuk meminimalkan kerusakan sel spermatozoa dengan menambahkan berbagai zat yang dibutuhkan ke dalam pengencer semen.

Bahan pengencer yang digunakan untuk tujuan penyimpanan spermatozoa, memegang peranan penting dalam upaya mempertahankan kualitas spermatozoa

selama masa penyimpanan. Pengencer yang telah umum digunakan dalam proses kriopreservasi semen dan telah dikenal luas adalah pengencer *AndroMed*<sup>®</sup>. Pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> tersebut memudahkan dalam penggunaannya karena telah tersedia dalam paket siap pakai dan mengandung seluruh bahan-bahan yang diperlukan untuk kriopreservasi semen. *AndroMed*<sup>®</sup> merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar Tris yang paling populer untuk pengencer semen beku sapi. *AndroMed*<sup>®</sup> merupakan bahan pengencer terdiri dari fosfolipid, tris-(hidroksimetil)-aminometan, asam sitrat, fruktosa, gliserol, tilosin, tartrat, gentamisin sulfat, dan linkomisin. (Anonymous, 2001).

Antioksidan adalah substansi nutrisi maupun non-nutrisi yang terkandung dalam bahan pangan yang mampu mencegah atau memperlambat terjadinya kerusakan oksidatif dalam tubuh. Penambahan antioksidan selama proses penyimpanan dapat memperlambat proses peroksidasi lipid oleh ROS (*Reactive Oxygen Species*). Tanaman yang memiliki kandungan antioksidan tinggi diantaranya adalah bawang merah (*Allium cepa*). Menurut Putri, Pudjadi, dan Kartikawati (2010) bawang merah mengandung zat-zat non gizi (fitokimia). Senyawa fitokimia yang terdapat dalam bawang merah yaitu allisin, alliin, allil propil disulfid, fitosterol, flavonol, flavonoid, kaempfenol, quersetin, quersetin glikosida, dll.

Penambahan ekstrak bawang merah (EBM) kedalam bahan pengencer dengan konsentrasi tertentu diharapkan mampu

mempertahankan integritas membran sehingga kualitas semen kambing PE dapat terjaga. Banyaknya antioksidan yang terdapat di dalam bawang merah akan mampu menangkal radikal bebas sehingga radikal bebas yang di hasilkan dari proses oksidasi pada semen di dalam masa penyimpanan akan berkurang. Menurut hasil penelitian Iswandi (2014) hasil viabilitas pada jam ke-4 masih memberikan nilai yang tinggi yaitu  $88,66 \pm 1,12\%$ , menunjukkan bahwa pengencer ringer's dextrose ditambah EBM memberikan kondisi yang sesuai untuk kelangsungan hidup spermatozoa selama penyimpanan.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka dirasa perlu diadakan penelitian tentang pengaruh penambahan EBM terhadap integritas membran spermatozoa kambing PE selama penyimpanan suhu dingin ( $4-5^{\circ}\text{C}$ ).

## **MATERI DAN METODE**

### **Materi dan Bahan Penelitian**

1. Semen segar Kambing PE , umur 2 tahun, bobot badan 60 kg dalam keadaan sehat. Motilitas individu 70% dan motilitas massa (+++). Semen kambing ditampung 2 kali per minggu dengan menggunakan vagina buatan.
2. Bahan pengencer yang digunakan adalah *AndroMed*<sup>®</sup> (minitube made in germany Ref.: 13503/0200) yang ditambah aquabides (IKA No. Reg : D.2018020-IV) dengan perbandingan 1:4. Bahan ekstrak merupakan bawang merah lokal yang diperoleh dari pasar Merjosari Malang.

3. Bahan pendukung yang digunakan berupa eosin-negrosin (BBIB Singosari), NaCl 3% (Merk KGaA reg.no K31519804 249),

### **Metode Penelitian**

Metode penelitian yang digunakan adalah percobaan laboratorium. Pola rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola tersarang. Perlakuan utama adalah kadar EBM 0%, 1%, 2%, 3%. Perlakuan tersarang adalah lama penyimpanan 1, 2 dan 3 jam pada suhu dingin ( $4-5^{\circ}\text{C}$ ). Semua perlakuan diulang sebanyak 16 kali.

### **Tahapan Penelitian**

1. Pembuatan Ekstrak Bawang Merah  
Bawang merah sebanyak 100 gram dikupas dan dicuci, dihaluskan dengan blender dan disaring dengan kain saring. Ekstrak bawang merah dicentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm dan dipisahkan dari residu di lakukan dua kali dengan kecepatan dan waktu yang sama. Selanjutnya ekstrak bawang merah dilakukan inaktifasi dalam oven bersuhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit dan disimpan pada suhu dingin dalam refrigerator (Caridi dkk., 2007).
2. Pembuatan larutan pengencer  
*AndroMed*<sup>®</sup> diencerkan dengan aquabides dengan perbandingan 1:4. Pengenceran dilakukan dengan cara aquabides dipipet sebanyak 20 ml, kemudian diletakkan di tabung reaksi. Aquabides ditambahkan secara langsung ke dalam tabung reaksi yang telah berisi *AndroMed*<sup>®</sup>

sebanyak 80 ml. AndroMed<sup>®</sup> yang telah ditambahkan aquabides dihomogen. Pengencer yang sudah homogen disimpan dalam refrigerator pada suhu 4-5<sup>0</sup>C sampai digunakan pada penelitian. Sebelum digunakan pengencer AndroMed<sup>®</sup> ditambah ekstrak bawang merah yang sebelumnya telah dibuat dengan kadar 0, 1, 2, dan 3%.

3. Pembuatan larutan HOST  
Larutan HOST dibuat dengan cara ditimbang 0,31 g :Na-sitrat. H<sub>2</sub>O (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O) dan 0,5659 g :d-fruktosa. Kedua bahan tersebut dihomogenkan dengan 50 ml aquabides dan disimpan pada suhu 4-5<sup>0</sup>C.
4. Penampungan semen, dua kali seminggu dengan metode vagina buatan.
5. Pemeriksaan semen segar meliputi makroskopis (warna, bau, kekentalan, pH dan volume) dan mikroskopis (konsentrasi, motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan integritas membran)
6. Semen diencerkan dengan larutan pengencer kemudian disimpan pada refrigerator.
7. Pengamatan semen setelah penyimpanan meliputi integritas membrane spermatozoa.

#### Analisa Data

Data yang di peroleh dari pengamatan kualitas semen dianalisa menggunakan analisis ragam dengan nilai taraf F 0,01. Jika hasil analisa ragam lebih kecil atau sama dengan nilai taraf F 0,01, maka akan dilanjutkan dengan Uji LSD, menggunakan software SPSS 16.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Semen Segar.

Pemeriksaan terhadap kuantitas dan kualitas semen segar dimaksudkan untuk menentukan apakah semen tersebut layak atau tidak diproses lebih lanjut dan untuk mengetahui kadar pengenceran yang dibutuhkan. Pemeriksaan secara makroskopis merupakan pemeriksaan semen secara langsung tanpa memerlukan alat bantu yang rumit, sedangkan pemeriksaan mikroskopis merupakan pemeriksaan yang bertujuan untuk melihat kondisi semen lebih dalam lagi serta memerlukan alat bantu yang cukup lengkap. Evaluasi makroskopis meliputi volume, warna, bau, kekentalan dan pH semen. Pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi, persentase hidup dan mati spermatozoa (Kartasudjana, 2001). Kualitas semen segar setelah penampungan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan kualitas semen segar kambing PE

Variabel	Rataan ± standart devisiasi
Volume (ml/ejakulasi)	1,2±0,18
Konsistensi	Kental
Ph	7
Warna	Putih Kekuningan
Bau	Khas
Motilitas massa	3+
Motilitas individu (%)	80
Viabilitas (%)	95,53±2,75
Abnormalitas (%)	1,32±0,471
Konsentrasi (10 <sup>6</sup> /ml)	3830±93.452
Integritas membran (%)	90,805±0,846

Sumber : Data primer 2014

Berdasarkan pada data karakteristik semen segar tersebut di atas, dapat

dikatakan bahwa kambing PE yang digunakan dalam penelitian ini memiliki semen dengan kualitas yang baik dan memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut. Hal ini karena semen segar tersebut memiliki konsistensi pekat, gerakan massa spermatozoa +++, persentase spermatozoa motil 80%, dan

persentase Integritas membran  $90,805 \pm 1,17\%$ . Semen segar yang baik harus memiliki konsistensi agak kental atau kental dan gerakan massa ++ atau +++ (Toelihere,1993), persentase spermatozoa motil  $>70\%$  (Evans dan Maxwell, 1989), dan persentase integritas membran minimum 60% (Revell dan Mrode, 1994).

### **Pengaruh Waktu Penyimpanan Selama Penyimpanan 1, 2 dan 3 jam Terhadap Integritas Membran Spermatozoa Kambing PE pada Suhu Dingin ( $4-5^{\circ}\text{C}$ ) dalam Pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> dengan Penambahan EBM**

Tabel 2. Integritas Membran Spermatozoa kambing PE pada Pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> dengan Penambahan EBM selama Penyimpanan Suhu Dingin

Konsentrasi EBM	Rataan integritas membran sel selama penyimpanan(%) ± Standart deviasi		
	Jam 1	Jam 2	Jam 3
<i>AndroMed</i> <sup>®</sup>	$84,37 \pm 1,03^a$	$74,76 \pm 1,33^a$	$64,71 \pm 1,68^a$
<i>AndroMed</i> <sup>®</sup> + 1% EBM	$82,43 \pm 1,15^b$	$72,38 \pm 1,53^b$	$62,38 \pm 1,53^b$
<i>AndroMed</i> <sup>®</sup> + 2% EBM	$85,81 \pm 1,47^c$	$76,67 \pm 1,40^c$	$67,04 \pm 2,12^c$
<i>AndroMed</i> <sup>®</sup> + 3% EBM	$82,56 \pm 1,46^b$	$72,71 \pm 1,73^b$	$61,67 \pm 1,63^b$

Keterangan: Notasi yang berbeda pada lajur yang sama menunjukkan bahwa tingkat penambahan ekstrak bawang merah memberikan perbedaan sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap integritas membran spermatozoa kambing PE

#### **Integritas membran sel spermatozoa**

Integritas membran spermatozoa adalah keutuhan membran spermatozoa atau suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran tetap terjaga sebagai kontrol terhadap sistem transport, motilitas dan viabilitas spermatozoa mempengaruhi fungsi integritas membran spermatozoa dalam ejakulasi spermatozoa yang mengalami kerusakan membran tidak dapat menunjukkan pembengkakan dibawah kondisi *hypoosmotik* (Esteves, Sharma, Thomas and Agarwal, 2000).

Evaluasi integritas membran plasma digunakan uji *hypoosmotic swelling test*

(HOST) dalam larutan *hypoosmotik* cairan masuk ke dalam sel melalui membran plasma spermatozoa untuk usaha mencapai keseimbangan antara ruang intraseluler dan ekstraseluler secara fungsional membran spermatozoa utuh mulai mengalami pembengkakan. Pembengkakan berperan penting untuk menggulung dan invaginasi, perubahan ekor dengan jelas kelihatan dibawah mikroskop cahaya, spermatozoa menunjukkan pembengkakan atau HOS reaktif (HOS+) hal ini menandakan membran spermatozoa yang utuh sedangkan membran spermatozoa yang fungsinya mengalami kerusakan tidak

mengalami pembengkakan dan ekor tidak terjadi invaginasi atau menggulung disebabkan rusaknya ultrastruktur biokimia dan fungsi membran (Jayendran, Van Der Ven, Pelaez, Crabo and Zaneveld, 1984).

Menurut Ariantie dkk. (2013) membran plasma yang rusak akan berpengaruh terhadap motilitas sehingga fertilitas akan terganggu. Ditambahkan oleh Setyadi dkk, (2006) bahwa penilaian kemampuan hidup spermatozoa (viabilitas spermatozoa) diukur melalui parameter persentase motilitas progresif dan membran plasma utuh (MPU).

Hasil penelitian presentase integritas membran semen persilangan kambing PE dalam pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> yang ditambahkan EBM yang disimpan pada suhu dingin dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan EBM 2% memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap integritas membran spermatozoa dibandingkan penambahan EBM lainnya. Pada penyimpanan jam ke-1 dapat dilihat bahwa persentase integritas membran pada perlakuan EBM 2% adalah sebesar (85,81 %), lebih besar daripada perlakuan dengan penambahan konsentrasi EBM 1% dan EBM 3%. Pada penyimpanan jam ke-2, penambahan EBM sebesar 2% memberikan persentase integritas membran lebih baik daripada penambahan EBM lainnya yaitu sebesar (76,67 %), begitu pula pada penyimpanan jam ke-3. Perlakuan dengan penambahan ekstrak bawang merah (EBM) 2% pada berbagai waktu penyimpanan menghasilkan rata-rata persentase integritas membran spermatozoa kambing PE paling baik daripada perlakuan EBM lainnya.

Kandungan *cryoprotectan* pada pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> dengan penambahan EBM di dalam media pengencer dapat menghambat terjadinya kerusakan oleh radikal bebas. Hal ini disebabkan oleh adanya kandungan quercetin di dalam bawang merah menjadi target ROS (*Reactive Oxygen Species*), sehingga ROS tidak mengoksidasi membran spermatozoa. Menurut Okada, Igarashi, Kuroda, Terao, Yoshikawa and Sankai (2001) ketika flavonol quercetin bereaksi dengan radikal bebas, quercetin mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal, tapi elektron tidak berpasangan yang dihasilkan didelokalisasi oleh resonansi, hal ini membuat senyawa *quercetin* radikal memiliki energi yang sangat rendah untuk menjadi radikal yang reaktif.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Integritas membran spermatozoa dapat dipertahankan dengan penambahan EBM 2% dalam pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> selama penyimpanan pada suhu dingin (4-5<sup>0</sup>C).

### Saran

Disarankan untuk melakukan penambahan EBM 2% dalam pengencer *AndroMed*<sup>®</sup> guna mempertahankan integritas membran spermatozoa persilangan kambing PE.

## DAFTAR PUSTAKA

Anonimous. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH & Co KG Germany. [http://www.minitube.de/DE\\_eng](http://www.minitube.de/DE_eng).

- Arifiantini, I., T.L. Yusuf dan N.Graha. 2005. Longivitas dan Recovery Rate Pasca Thawing Semen Beku Sapi Friesian Holstein Menggunakan Bahan Pengencer yang Berbeda. Buletin Peternakan. Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor. 29 (2)
- Caridi, D., V. C. Trenerry, S. Rochfort, S. Duong, D. Laughler dan R. Jones. 2007. Profiling and Quantifying Quercetin Glucosides in Onion (*Allium cepa* L.) Varieties Using Capillary Zone Electrophoresis and High Performance Liquid Chromatography. Food Chemistry 105: 691-699.
- Esteves, S. C., R. K. Sharma, A. J., Thomas and A. Agarwal. 2000. Improvement in Motion Characteristics and Acrosome Status in Cryopreserved Human Spermatozoa by Swim-up Processing Before Freezing. Hum Reprod. 15: 2173-2179.
- Evans, W. H. and J. M. Graham. 1989. Membran Structure and Function. IRL Press. Oxford University. Oxford : 11 – 28.
- Iswandi. 2014. Pengaruh Lama Simpan Semen Kambing Peranakan Etawah dalam Pengencer Ringer's Dektros dengan Esktrak Bawang Merah (*Allium cepa*) pada Penyimpanan Suhu Kamar. Skripsi. Jurusan Produksi Ternak. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Jayendran, R. S., H. H. Van Der Ven, M. P. Pelaez, B. G. Crabo, L. J. D. and Zaneveld. 1984. Development of an Assay to Assess the Functional Integrity of the Human Sperm Membrane and its Relationship to Other Semen Characteristics. J. Reprod. Fertil. 70: 219-228.
- Kartasudjana, R. 2001. Teknik Inseminasi Buatan Pada Ternak. Jakarta.
- Okada A, H. Igarashi, M. Kuroda, K. Terao, Y. Yoshikawa and T. Sankai. 2001. Cryopreservation-Induced Acrosome Vesiculation in Live Sperm from *Cynomolgus* Monkeys (*Macaca fascicularis*). Hum. Reprod. 16: 2139-2147.
- Putri R. H., Pudjadi dan H. Kartikawati, 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Bawang Merah (*Allium Ascalonicum*) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol HDL Serum Tikus Wistar Dengan Hiperglikemia. Artikel Penelitian. program pendidikan S-1 Kedokteran Umum FK UNDIP. Hal 1-15
- Revell, S. G. and R. A. Mrode. 1994. An Osmotic Resistance Test for Bovine Semen. Anim. Reprod. Sci. 36:77 -86.
- Setiadi, M. A., A. Suprayogi dan Yulnawati. 2006. Viabilitas dan Integritas Membrane Plasma Spermatozoa Epididymis Anjing Selama Penyimpanan pada Pengencer yang Berbeda. Media Kedokteran Hewan 22(2): 118 – 123.
- Sugito. 2004. Penelitian dan Pengembangan Pemuliaan Bibit

Unggul Kambing Peranakan  
Etawa. UPT-PUSTAKA. UNDIP.

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

Yulnawati dan M. A Setiadi. 2005.  
Motilitas dan Keutuhan Membran  
Plasma Spermatozoa Epididimis  
Kucing selama Penyimpanan pada  
Suhu 4°C. J. Med Vet. 21:100-  
104.