

PENGGUNAAN VITAMIN E DAN BHT DALAM PENGECER SEMEN BEKU DOMBA

FERADIS

*Badan Penelitian dan Pengembangan Provinsi Riau
Jl. Diponegoro No. 24 A Pekanbaru, E-mail : feradis_dr@yahoo.com*

ABSTRACT

A study about the use of vitamin E and BHT in frozen ram semen extender has done. Tris citrate, lactose and skim milk as extenders and vitamin E and BHT as antioxidants with certain doses were used in this experiment. The quality of semen such as motility, live sperm, intact plasma membrane and intact acrosome membrane were evaluated. The objectives of this study are to determine the best extender and antioxidant with certain doses in cryopreservation of ram semen. Based on this study it was found that the skim milk extender (50.0 and 62.5% respectively) showed the best quality of sperm motility and live sperm after thawing. The mean percentage of intact plasma membrane and intact acrosome on skim milk extender also showed the best result (58.3 and 61.0% respectively). The supplement of 0.2 g vitamin E showed higher rate of sperm motility, live sperm, intact plasma membrane and intact acrosome after thawing than the other treatments (51.9, 65.4, 61.3 and 64.2 percent respectively). It can be concluded that the supplementation of 0.2 g vitamin E using the skim milk extender gave the best quality in ram semen cryopreservation.

Keywords: antioxidant, BHT, cryopreservation, semen, vitamin E.

PENDAHULUAN

Salah satu penyebab kerusakan pada spermatozoa selama proses kriopreservasi sampai pencairan kembali adalah peroksidasi lipid. Kerentanan spermatozoa terhadap peroksidasi lipid dapat meningkat disebabkan oleh cekaman dingin (Pursel, 1979). Proses peroksidasi mengubah struktur spermatozoa, terutama pada bagian membran dan akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler (Jones dan Mann, 1977). Keadaan ini dapat dicegah dengan menambahkan antioksidan ke dalam pengencer semen. Vitamin E (α -tokoferol) telah dibuktikan dapat melindungi membran plasma spermatozoa sapi selama pembekuan sampai pencairan kembali (Beconi *et al.*, 1993), sedangkan BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) dapat mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa yang disebabkan cekaman dingin dan memberikan perlindungan terhadap

perubahan yang disebabkan pembekuan (Hammerstedt *et al.*, 1976). Vitamin E dan BHT akan mencegah peroksidasi lipid melalui pemberian atom-atom hidrogennya yang cepat kepada radikal peroksidil/lipid (Wijaya, 1996).

Pengencer yang biasa digunakan untuk pengenceran semen domba antara lain adalah tris sitrat, laktosa dan susu skim yang dikombinasikan dengan kuning telur. Menurut Jones dan Mann (1977), kuning telur dan susu skim dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan peroksidasi lipid. Kuning telur dan susu diduga membentuk lapisan pelindung terhadap sel spermatozoa, mencegah peroksidasi lipid melalui interaksinya dengan sel spermatozoa atau berkombinasi langsung dengan peroksida dan kemudian menetralkan pengaruhnya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan jenis pengencer dan antioksidan dengan dosis terbaik dalam proses kriopreservasi semen domba.

MATERI DAN METODA

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi Reproduksi Balai Penelitian Ternak Ciawi, Bogor. Dalam penelitian ini digunakan semen yang ditampung dari enam ekor domba St. Croix jantan dengan umur lebih kurang dua sampai tiga tahun dan rataan bobot badan $45 \pm 7,6$ kg. Ternak percobaan ditempatkan di dalam kandang individu yang dilengkapi tempat makan dan air minum. Pakan yang diberikan berupa Rumpuk Gajah segar yang dicacah sebanyak 5 sampai 6 kg dan konsentrat 0,5 sampai 0,6 kg per ekor per hari serta mineral secukupnya. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

Bahan-bahan yang digunakan adalah vitamin E, BHT, akuabides, eosin-negrosin, nitrogen cair, alkohol, bahan-bahan untuk pengukuran kadar peroksidasi lipid (MDA, *malonaldehid*). Pengencer yang digunakan adalah tiga macam pengencer, yaitu tris sitrat (A₁), laktosa (A₂) dan susu skim (A₃) (Tabel 1).

Metode Penelitian

1. Penampungan Semen

Semen domba pejantan ditampung dengan vagina buatan pada pagi hari sekitar jam 08.00 WIB dan dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis di laboratorium. Semen yang dipakai adalah semen dengan kualitas baik (konsentrasi $\geq 2.000 \times 10^6$ /ml, motilitas $\geq 70\%$, abnormalitas $< 15\%$).

Tabel 1. Komposisi Bahan Pengencer Dasar yang Digunakan dalam Penelitian

Bahan	Tris Sitrat (A ₁)	Laktosa (A ₂)	Susu Skim (A ₃)
Tris (<i>hydroxymethyl amino methane</i> , gr)	2,42	-	-
Asam Sitrat, g	1,28	-	-
Fruktosa, g	2,16	2,16	2,16
Laktosa, g	-	10,00	-
Susu Skim, g	-	-	9,00
Kuning Telur, %	20,00	20,00	20,00
Gliserol, %	7,00	7,00	7,00
Penisilin, i.u./ml	1.000,00	1.000,00	1.000,00
Streptomisin, mg/ml	0,50	0,50	0,50
Akuabides, ad	100,00	100,00	100,00

2. Pengencer Semen

Sebagai bahan pengencer semen dipakai pengencer tris sitrat, laktosa dan susu skim seperti tercantum pada Tabel 1. Penambahan vitamin E dan BHT ke dalam setiap 100 ml bahan pengencer disesuaikan dengan kombinasi perlakuan sesuai Tabel 2.

Tabel 2. Dosis Vitamin E dan BHT yang Ditambahkan pada setiap 100 ml Pengencer

Perlakuan	Komposisi
A ₁ B ₁	Tris Sitrat
A ₁ B ₂	Tris Sitrat + 0,1 gr vitamin E
A ₁ B ₃	Tris Sitrat + 0,2 gr vitamin E
A ₁ B ₄	Tris Sitrat + 0,1 gr BHT
A ₁ B ₅	Tris Sitrat + 0,2 gr BHT
A ₂ B ₁	Laktosa
A ₂ B ₂	Laktosa + 0,1 gr vitamin E
A ₂ B ₃	Laktosa + 0,2 gr vitamin E
A ₂ B ₄	Laktosa + 0,1 gr BHT
A ₂ B ₅	Laktosa + 0,2 gr BHT
A ₃ B ₁	Susu Skim
A ₃ B ₂	Susu Skim + 0,1 gr vitamin E
A ₃ B ₃	Susu Skim + 0,2 gr vitamin E
A ₃ B ₄	Susu Skim + 0,1 gr BHT
A ₃ B ₅	Susu Skim + 0,2 gr BHT

3. Pengenceran dan Pendinginan Semen

Proses pembekuan menggunakan metode 2 tahap, dimana setiap pengencer dibagi menjadi 2 bagian A dan B. Pada pengencer bagian A ditambahkan semen dengan konsentrasi spermatozoa motil sebesar $400 \times 10^6/\text{ml}$. Semen yang telah diencerkan didinginkan secara perlahan di dalam mesin pendingin sampai suhu 5°C dan ditambahkan pengencer B. Kemudian semen dimasukkan ke dalam mini straw (0,25 ml) dan ditutup dengan serbuk *polyvinylchloride* (PVC) dan diekuilibrasikan pada suhu 5°C selama dua jam di dalam ruang pendingin.

4. Pembekuan Semen

Pembekuan semen dilakukan dengan menempatkan rak yang berisi mini straw pada uap nitrogen cair selama 10 menit, kemudian dimasukkan ke dalam nitrogen cair (-196°C) dan disimpan di dalam kontainer yang berisi nitrogen cair. Setelah lebih kurang satu minggu dilakukan pencairan kembali (*thawing*) dengan menempatkan mini straw semen beku ke dalam air hangat dengan suhu 37°C selama 15 detik. Setelah pengenceran, pendinginan dan pencairan kembali dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen.

5. Pengukuran Parameter

Parameter yang diukur dalam evaluasi semen meliputi :

- Kuantitas dan kualitas semen segar : volume, warna, kekentalan, pH, gerakan masa, konsentrasi, persentase motilitas, hidup, tudung akrosom utuh (TAU) dan membran plasma utuh (MPU).
- Kualitas spermatozoa setelah diencerkan dan diekuilibrasikan : persentase motilitas, hidup, TAU dan MPU.

- Kualitas spermatozoa setelah dicairkan kembali : persentase motilitas, hidup dan TAU, MPU dan kadar peroksidasi lipid (MDA).

6. Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah RAK pola Faktorial 3×5 dengan enam ulangan. Data percobaan diuji dengan analisis varian (ANOVA) (Steel dan Torrie, 1993). Untuk menguji antar perlakuan dilakukan dengan uji lanjut Kontras Ortogonal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Sifat-sifat Fisik Semen Segar

Hasil pemeriksaan semen segar domba St. Croix yang mencakup sifat-sifat fisik semen tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Nilai Sifat Fisik Semen Segar Domba St. Croix yang Digunakan Selama Penelitian

No	Parameter	Ukuran
1	Volume (ml)	$1,54 \pm 0,41$
2	Warna	krem
3	Konsistensi	kental
4	Derajat keasaman (pH)	$6,8 \pm 0,01$
5	Gerakan massa	+++
6	Konsentrasi (juta/ml)	$3,785 \pm 343,79$
7	Motilitas (%)	$81,67 \pm 2,58$
8	Persentase hidup (%)	$89 \pm 2,37$
9	Tudung akrosom utuh (TAU) (%)	$94 \pm 1,27$
10	Membran plasma utuh (MPU) (%)	$86,33 \pm 2,34$
11	Abnormalitas (%)	$8,33 \pm 1,37$

2. Kualitas Spermatozoa Setelah Perlakuan

2.1 Persentase Motilitas

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pengencer susu skim (A_3) lebih unggul dibandingkan dengan laktosa (A_2) dan tris sitrat (A_1) dalam menekan penurunan persentase motilitas semen. Hal ini terlihat pada nilai persentase motilitas tertinggi yang diperoleh pada pengencer A_3 (80,17%) diikuti oleh A_2 (79,67%) dan A_1 (79,17%) pada tahap setelah pengenceran. Setelah ekuilibrisasi pengencer A_3 (71,00%) lebih tinggi daripada A_2 (68,50%) dan A_1 (67,00%). Demikian pula setelah pencairan kembali, nilai motilitas pada pengencer A_3 (50,00%) juga lebih tinggi daripada A_2 (46,33%) dan A_1 (43,67%) (Lampiran 1). Begitu juga penambahan antioksidan terutama 0,2 g vitamin E (B_3) mempunyai kemampuan mempertahankan motilitas lebih baik daripada kontrol atau tanpa antioksidan (B_1), penambahan 0,1 g vitamin E (B_2), 0,1 g BHT (B_4) dan 0,2 g BHT (B_5). Ini terlihat dari hasil persentase motilitas tertinggi setelah pengenceran, diperoleh pada B_3 (80,56%) diikuti oleh B_5 (80,28%), B_2 (79,44%), B_4 (79,44%) dan B_1 (78,61%). Hasil yang sama juga diperoleh setelah ekuilibrisasi, dimana B_3 (72,78%) lebih tinggi dibandingkan dengan B_5 (70,28%), B_2 (69,17%), B_4 (67,22%) dan B_1 (64,72%). Setelah pencairan kembali semakin jelas terlihat bahwa B_3 (51,94%) mempunyai persentase motilitas lebih tinggi daripada B_5 (48,33%), B_2 (46,39%), B_4 (44,44%) dan B_1 (43,06%) (Lampiran 1).

Uji statistik menunjukkan bahwa pengelompokan ternak dan interaksi antara perlakuan pengencer dan antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa. Pada tahap pengenceran, faktor pengencer dan antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$). Pada tahap setelah ekuilibrisasi dan pencairan kembali, kedua faktor berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$).

Persentase motilitas spermatozoa semen yang diencerkan dengan susu skim lebih tinggi daripada tris sitrat dan laktosa terutama setelah ekuilibrisasi dan pencairan kembali. Hal ini terjadi karena susu skim mengandung substansi pelindung yaitu lesitin yang berfungsi melindungi spermatozoa dari cekaman dingin selama pembekuan semen.

Keunggulan lain susu skim yang digunakan yaitu mengandung vitamin C sebesar 75 mg/100 g susu skim. Vitamin C dikenal sebagai salah satu antioksidan yang dapat menjaga membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama proses pembekuan. Beconi *et al.* (1993) melaporkan bahwa vitamin C mampu melindungi membran plasma spermatozoa sapi selama proses pembekuan dan pencairan kembali. Selanjutnya dijelaskan, pada semen dengan kualitas yang baik, penambahan vitamin C dapat menurunkan kerentanan membran plasma terhadap peroksidasi dibandingkan dengan kontrol.

Tingginya persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan penambahan antioksidan, baik vitamin E maupun BHT disebabkan

karena kemampuan antioksidan menghambat terjadinya proses peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid pada spermatozoa domba dapat menyebabkan kehilangan motilitas, hambatan terhadap fruktolisis dan respirasi, keluarnya enzim intraseluler dan kerusakan struktur membran plasma (Jones dan Mann, 1977).

Persentase motilitas terutama setelah ekuilibrisasi dan setelah pencairan kembali lebih tinggi pada perlakuan penambahan vitamin E daripada BHT. Hal ini karena vitamin E mampu menghambat proses peroksidasi lipid dibandingkan dengan BHT. Keunggulan lain vitamin E adalah kemampuannya yang dapat didaur ulang setelah digunakan oleh sel spermatozoa dengan bantuan vitamin C yang terkandung dalam semen domba. Rataan kandungan vitamin C dalam semen domba adalah 5 mg/dl semen dengan rentang 2 sampai 8 mg/dl semen (Pineda, 1989).

Menurut Wijaya (1996) mekanisme daur ulang vitamin E berjalan sesuai urutan reaksi-reaksi berikut :



Jadi fungsi vitamin C di sini adalah untuk mendaur ulang tokoferol. Sedangkan semidehidroaskorbat akan dikembalikan menjadi askorbat oleh enzim NADH (enzim NADH-semidehidroaskorbat reduktase) atau glutation tereduksi (enzim dehidro-askorbat reduktase).

Persentase motilitas spermatozoa yang tertinggi setelah pencairan kembali diperoleh pada kombinasi perlakuan pengencer susu skim dan penambahan 0,2 g vitamin E (A_3B_3) yang berkisar antara 50 sampai 60% dengan rata-rata 55%. Hasil ini lebih tinggi dari hasil yang dilaporkan oleh Ritar dan Ball (1993) yang menyatakan nilai persentase motilitas spermatozoa domba setelah pencairan kembali adalah sebesar 43,9% dan menurut Maxwell *et al.* (1995) sebesar 49,2%.

2.2 Persentase Hidup

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase hidup tertinggi setelah pengenceran semen diperoleh pada pengencer susu skim (A_3) sebesar 86,07%, diikuti oleh laktosa (A_2) sebesar 85,40% dan tris sitrat (A_1) sebesar 84,70%. Setelah ekuilibrisasi, persentase hidup pada A_3 (79,40%) lebih tinggi daripada A_2 (78,97%) dan A_1 (76,87%). Setelah pencairan kembali, nilai persentase hidup lebih tinggi pada A_3 (62,53%), kemudian A_2 (59,03%) dan A_1 (56,90%) (Lampiran 2). Ini menunjukkan bahwa pengencer susu skim (A_3) lebih unggul dibandingkan dengan pengencer lainnya. Begitu juga dengan penambahan 0,2 g vitamin E (B_3) mempunyai kemampuan mempertahankan daya hidup spermatozoa yang lebih baik daripada kontrol dan perlakuan lainnya. Ini terlihat dari hasil persentase hidup tertinggi setelah tahap pengenceran diperoleh pada B_3 (86,83%) diikuti oleh B_5 (85,72%), B_2 (85,39%), B_4 (84,78%) dan B_1 (84,22%). Hasil yang sama juga diperoleh setelah semen diekuilibrisasi, dimana B_3 (81,56%) lebih tinggi dibandingkan dengan

perlakuan B₅ (79,44%), B₂ (78,83%), B₄ (77,72%) dan B₁ (75,00%). Setelah pencairan kembali semakin jelas terlihat bahwa B₃ (65,39%) mempunyai persentase hidup lebih tinggi daripada B₅ (61,22%), B₂ (59,50%), B₄ (57,00%) dan B₁ (54,33%) (Lampiran 2).

Uji statistik menunjukkan bahwa pengelompokan ternak dan interaksi antara perlakuan pengencer dan antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap persentase hidup spermatozoa pada ketiga tahap pengolahan semen. Pada tahap pengenceran, faktor pengencer dan antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$). Setelah ekuilibrasi, faktor pengencer berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$), sedangkan faktor antioksidan berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$). Setelah pencairan kembali, kedua faktor berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$).

Pengencer susu skim menghasilkan persentase hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer laktosa dan tris sitrat. Hal ini terjadi karena susu skim mempunyai kemampuan yang lebih tinggi dalam menjaga viabilitas sel spermatozoa. Lesitin yang terkandung di dalam susu skim memberikan perlindungan kepada spermatozoa terhadap cekaman dingin yang dapat berakibat buruk pada spermatozoa. Selain menyebabkan perubahan fisik dan kimia, cekaman dingin juga menyebabkan kematian pada spermatozoa. Hal ini didukung oleh pendapat John dan Stewart (1979), yang mengemukakan bahwa terjadinya perubahan ultrastruktur pada sel spermatozoa yang diakibatkan oleh cekaman dingin

menyebabkan viabilitas spermatozoa sangat rendah.

Persentase hidup spermatozoa lebih tinggi pada penambahan 0,2 g vitamin E baik pada tahap setelah pengenceran, ekuilibrasi maupun pencairan kembali. Tingginya persentase hidup spermatozoa pada penambahan antioksidan karena antioksidan dapat menjaga spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh peroksidasi lipid.

Nilai persentase hidup yang tertinggi baik pada tahap setelah pengenceran, ekuilibrasi maupun pencairan kembali, diperoleh pada kombinasi perlakuan antara pengencer susu skim dan penambahan 0,2 g vitamin E (A₃B₃). Pada tahap setelah pengenceran, nilai persentase hidup pada perlakuan A₃B₃ sebesar 87,17% dengan rentang 85 sampai 90%, setelah ekuilibrasi 82,50% dengan rentang 80 sampai 86%. Setelah pencairan kembali, nilai persentase hidup pada perlakuan A₃B₃ adalah sebesar 69% dengan rentang 67 sampai 73%.

2.3 Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU)

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase MPU dan TAU tertinggi setelah pengenceran semen diperoleh pada A₃ dengan nilai masing-masing 84,27% dan 90,67%, diikuti oleh A₂ dan A₁ dengan nilai masing-masing sebesar 83,63% dan 90,57% serta 83,13% dan 90,20%. Hasil yang sama juga diperlihatkan pada tahap setelah ekuilibrasi, dimana nilai persentase MPU dan TAU pengencer A₃ (74,13% dan 85,30%) lebih tinggi dibandingkan

dengan A₂ (71,80% dan 84,27%) dan A₁ (69,83% dan 82,50%). Demikian pula setelah tahap pencairan kembali, nilai A₃ (58,10 dan 61,03%) lebih tinggi daripada A₂ (54,60% dan 58,67%) dan A₁ (51,73% dan 56,73%) (Lampiran 3 dan 4). Hal ini menunjukkan bahwa A₃ lebih unggul daripada pengencer yang lain. Begitu juga dengan penambahan antioksidan ke dalam setiap pengencer pada penelitian ini lebih mampu menekan penurunan persentase MPU dan TAU daripada kontrol, terutama pada tahap setelah ekuilibrisasi dan pencairan kembali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah tahap pengenceran persentase MPU dan TAU tertinggi diperoleh pada B₃ dengan nilai masing-masing 84,44% dan 90,94%, diikuti oleh B₅ dengan nilai 84,39% dan 90,67%, B₂ dengan nilai 83,22% dan 90,56%, B₄ dengan nilai 83,22% dan 90,11% dan B₁ dengan nilai 83,11% dan 90,11%. Hasil yang sama juga diperoleh setelah semen diekuilibrisasi, dimana B₃ (76,50% dan 86,89%) lebih tinggi dibandingkan dengan B₅ (74,06% dan 85,39%), B₂ (73,00% dan 84,56%), B₄ (70,28% dan 83,22%) dan B₁ (65,78% dan 80,06%). Setelah pencairan kembali semakin jelas terlihat bahwa B₃ (61,28% dan 64,22%) mempunyai persentase MPU dan TAU yang lebih tinggi daripada B₅ (57,06% dan 61,50%), B₂ (54,78% dan 59,00%), B₄ (52,78% dan 56,61%) dan B₁ (48,50% dan 52,72%) (Lampiran 3 dan 4).

Uji statistik menunjukkan bahwa pengelompokan ternak dan interaksi antara pengencer dan antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap persentase MPU dan TAU spermatozoa pada ketiga tahap pengolahan semen. Pada tahap pengenceran, faktor pengencer dan

antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$). Sedangkan setelah ekuilibrisasi dan pencairan kembali, kedua faktor berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$).

Pengencer susu skim menghasilkan persentase MPU dan TAU spermatozoa yang lebih tinggi baik setelah pengenceran, ekuilibrisasi maupun pencairan kembali. Ini dikarenakan susu skim mengandung berbagai komponen yang bermanfaat dalam memelihara integritas membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa di antaranya adalah lesitin, glukosa dan vitamin C. Lesitin mampu memberikan perlindungan terhadap tudung akrosom dan membran plasma sel spermatozoa terhadap kerusakan yang disebabkan oleh cekaman dingin. Lesitin bekerja sama dengan lipoprotein yang terdapat pada kuning telur melindungi spermatozoa melalui penempelannya dengan kuat pada membran plasma. Lipoprotein juga bersifat krioprotektif yang berfungsi menstabilkan membran plasma selama proses pembekuan dan pencairan kembali.

Jones dan Mann (1977) melaporkan bahwa pengencer susu skim dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan peroksidasi lipid. Susu skim diduga membentuk lapisan pelindung terhadap spermatozoa, mencegah peroksidasi lipid melalui interaksinya dengan sel spermatozoa atau berkombinasi langsung dengan peroksida kemudian menetralkan pengaruhnya.

Perlakuan penambahan antioksidan ke dalam pengencer semen memberikan persentase tudung akrosom utuh dan membran

plasma utuh yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Hal ini semakin membuktikan bahwa antioksidan mampu melindungi integritas membran plasma dan tudung akrosom sel spermatozoa. Bila keadaan membran plasma tetap utuh, maka seiring dengan itu akrosom yang berada didalamnya ikut terlindungi. Sesuai dengan fungsinya, antioksidan akan melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk yang disebabkan oleh radikal bebas.

Pada perlakuan penambahan antioksidan, penambahan 0,2 g vitamin E terlihat lebih baik dalam mempertahankan keutuhan tudung akrosom dan membran plasma sel spermatozoa dibandingkan dengan perlakuan lain baik setelah pengenceran, ekuilibrasi maupun setelah pencairan kembali. Dalam hal ini vitamin E mempunyai aktivitas biologi yang lebih besar daripada BHT. Vitamin E mempunyai fungsi dasar yang penting dalam memelihara integritas membran pada seluruh sel tubuh, termasuk sel spermatozoa. Fungsi antioksidan vitamin E meliputi reduksi radikal bebas yang kemudian menghambat reaksi yang mempunyai kemampuan merusak seperti tingginya spesies oksidasi reaktif.

Mayes (1995) menyatakan bahwa vitamin E merupakan baris pertama pertahanan terhadap proses peroksidasi asam-asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam pospolipid membran seluler dan subseluler. Pospolipid pada mitokondria, retikulum endoplasmik serta membran plasma mempunyai afinitas terhadap vitamin E, dan vitamin E terkonsentrasi pada tempat-tempat ini. Vitamin E bertindak

sebagai antioksidan dengan memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas sebagai akibat kemampuannya untuk memindahkan hidrogen fenolat kepada radikal bebas peroksil dari asam lemak tak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi. Radikal fenoksi yang terbentuk kemudian bereaksi dengan radikal bebas peroksil selanjutnya.

Pada kombinasi perlakuan antara pengencer semen dan penambahan antioksidan, nilai persentase MPU dan TAU yang tertinggi diperoleh pada kombinasi perlakuan pengencer susu skim dan penambahan 0,2 g vitamin E (A_3B_3) baik setelah pengenceran, ekuilibrasi maupun setelah pencairan kembali. Pada tahap setelah pengenceran nilai MPU dan TAU pada kombinasi perlakuan A_3B_3 yaitu 84,83% dan 90,83%. Pada tahap setelah ekuilibrasi nilai persentase MPU dan TAU spermatozoa adalah 78,00% dan 88,50%, dan setelah pencairan kembali 65,00% dan 66,83%.

Nilai persentase MPU setelah pencairan kembali yang diperoleh pada kombinasi perlakuan A_3B_3 pada penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian yang dilaporkan oleh Valcarcel *et al.* (1997) yaitu sebesar $44 \pm 10\%$. Begitu juga dengan nilai persentase TAU setelah pencairan kembali yang diperoleh pada kombinasi perlakuan pengencer susu skim dan penambahan 0,2 g vitamin E (A_3B_3) lebih tinggi dari hasil yang diperoleh oleh Valcarcel *et al.* (1997) sebesar $43 \pm 10\%$.

2.3 Kadar Malonaldehid (MDA) Spermatozoa

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar MDA terendah setelah tahap ekuilibrasi semen diperoleh pada pengencer susu skim (A_3) sebesar 3,25 nmol/ml diikuti oleh tris sitrat (A_1) sebesar 3,36 nmol/ml dan laktosa (A_2) sebesar 3,39 nmol/ml. Demikian pula setelah tahap pencairan kembali, kadar MDA pada A_3 (5,92 nmol/ml) lebih rendah daripada A_2 (6,10 nmol/ml) dan A_1 (6,16 nmol/ml) (Lampiran 5). Penambahan 0,2 g vitamin E (B_3) mempunyai kemampuan menekan kadar MDA spermatozoa yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Ini terlihat dari kadar MDA terkecil setelah ekuilibrasi yang diperoleh pada perlakuan B_3 (2,30 nmol/ml) diikuti oleh perlakuan B_5 (2,47 nmol/ml), B_2 (2,61 nmol/ml), B_4 (2,88 nmol/ml) dan B_1 (6,40 nmol/ml). Hasil yang sama juga diperoleh setelah semen dicairkan kembali, dimana B_3 (4,80 nmol/ml) lebih rendah dibandingkan dengan B_5 (4,99 nmol/ml), B_2 (5,24 nmol/ml), B_4 (5,54 nmol/ml) dan B_1 (9,70 nmol/ml) (Lampiran 5).

Uji statistik menunjukkan bahwa pengelompokan ternak dan interaksi antara perlakuan pengencer dan antioksidan berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap kadar MDA spermatozoa baik setelah tahap ekuilibrasi maupun setelah tahap pencairan kembali. Pada tahap ekuilibrasi, faktor pengencer berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$), sedangkan faktor antioksidan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$). Setelah pencairan kembali, faktor pengencer berpengaruh nyata ($P < 0,05$), sedangkan faktor

antioksidan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$).

Pengencer susu skim menghasilkan kadar MDA yang lebih rendah baik setelah ekuilibrasi maupun setelah pencairan kembali. Ini dikarenakan pengencer susu skim mengandung vitamin C yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Vitamin C dapat menetralkan pengaruh buruk dari peroksidasi lipid dengan mengikat oksigen radikal bebas yang terdapat dalam plasma semen maupun pada spermatozoa sehingga menghambat proses peroksidasi lipid.

Pada perlakuan penambahan 0,2 g vitamin E terlihat lebih baik dalam menekan kadar MDA baik setelah ekuilibrasi maupun setelah pencairan kembali. Vitamin E bertindak sebagai antioksidan yang dapat meminimalkan kerusakan peroksidatif.

Pada kombinasi perlakuan antara pengencer semen dan penambahan antioksidan, kadar MDA yang terendah diperoleh pada kombinasi perlakuan pengencer susu skim dan penambahan 0,2 g vitamin E (A_3B_3) baik setelah ekuilibrasi maupun setelah pencairan kembali. Pada tahap setelah ekuilibrasi kadar MDA adalah 2,2 nmol/ml dan setelah pencairan kembali 4,66 nmol/ml.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pengencer susu skim adalah yang terbaik dibandingkan pengencer lainnya. Penambahan antioksidan vitamin E dengan dosis 0,2 g menghasilkan semen beku domba yang lebih baik daripada antioksidan lainnya.

Saran

Semen beku terbaik yang diperoleh dari penelitian ini sebaiknya diinseminasikan sehingga dapat diketahui angka kebuntingan yang diperoleh.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Mozes R. Toelihere, Bapak Barizi, Ibu Tuty L. Yusuf, Bapak Bambang Purwantara dan Bapak I. Ketut Utama atas bantuan dan bimbingannya. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada pimpinan dan staf Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Balai Penelitian Ternak Ciawi yang telah memberikan bantuan selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Beconi, M. T., C. R. Francia, N. G. Mora and M. A. Affranchino. 1993. Effect of Natural Antioxidants on Frozen Bovine Semen Preservation. *Theriogenology* 40:841-851.
- Hammerstedt, R. H. R. P. Amann, T. Rucinsky, P. D. Morse II, J. Lepock, W. Snipes and A. D. Keith. 1976. Use of Spin Labels and Electron Spin Resonance Spectroscopy to Characterize Membranes of Bovine Sperm: Effect of Butylated Hydroxitoluene and Cold Shock. *Biol. of. Reprod.* 14:381-397.
- John, R. C. and D. L. Stewart. 1979. The Effect of Cooling to 5°C and Freezing and Thawing on The Ultrastructure of Bull Spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 36:733-742.
- Jones, R. and T. Mann. 1977. Toxicity of Exogenous Fatty Acid Peroxides Towards Spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 50:255-260.
- Maxwell, W. M. C., A. J. Landers and G. Evans. 1995. Survival and Fertility of Ram Spermatozoa Frozen in Pellets, Straws and Minitub. *Theriogenology*. 43:1201-1210.
- Mayes, P. A. 1995. Struktur dan Fungsi Vitamin yang Larut Dalam Lemak. Dalam D. H. Ronardy dan J. Oswari (Eds.). *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta. pp.681-691.
- Pineda, M. H. 1989. Male reproduction. Dalam L. E. McDonald and M. H. Pineda: (Eds.). *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea and Febiger, Philadelphia, London.
- Pursel, V. G. 1979. Effect of Cold Shock on Boar Sperm Treated With Butylated Hydroxitoluene. *Biol. Reprod.* 21:319-325.
- Ritar, A. J. and P. D. Ball. 1993. The Effects of Freeze-Thawing of Goat and Sheep Semen at a High Density of Spermatozoa on Cell Viability and Fertility After Insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 31:249-262.
- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Varcarsel, A., M. A. de las Heras, L. Perez, D. F. Moses and H. Baldassarre. 1997. Assesment of the Arcosomal Status of Membrane-Intact Ram Spermatozoa After Freezing and Thawing, by Simultaneous Lectin/Hoechst 33258 Staining. *Anim. Sci.* 45:229-309.
- Wijaya, A. 1996. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. *Forum Diagnosticum* No. 1. Laboratorium Klinik Prodia.

Penggunaan Vitamin E dan BHT dalam Pengencer Semen Beku Domba

Lampiran 1. Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa Domba St. Croix masing-masing Kombinasi Perlakuan pada Ketiga Tahap Pengolahan Semen (%)

Tahap Pengolahan	Anti-oksidaan	Jenis Pengencer			Rataan
		A ₁	A ₂	A ₃	
Setelah Pengenceran	B ₁	78,33 ± 2,58	78,33 ± 2,58	79,17 ± 2,04	78,61 ± 0,48 ^a
	B ₂	79,17 ± 2,04	80,00 ± 3,16	79,17 ± 2,04	79,44 ± 0,48 ^a
	B ₃	80,83 ± 2,04	80,00 ± 3,16	80,83 ± 2,04	80,56 ± 0,48 ^a
	B ₄	78,33 ± 2,58	79,17 ± 2,04	80,83 ± 2,04	79,44 ± 1,27 ^a
	B ₅	79,17 ± 2,04	80,83 ± 2,04	80,83 ± 2,58	80,28 ± 0,96 ^a
	Rataan	79,17 ± 1,72 ^a	79,67 ± 1,03 ^a	80,17 ± 0,75 ^a	
Setelah Ekuilibrasi	B ₁	61,67 ± 2,58	65,00 ± 3,16	67,50 ± 2,74	64,72 ± 2,92 ^a
	B ₂	66,67 ± 2,58	69,17 ± 3,76	71,67 ± 2,58	69,17 ± 2,50 ^c
	B ₃	71,67 ± 2,58	73,33 ± 2,58	73,33 ± 2,58	72,78 ± 0,96 ^e
	B ₄	65,83 ± 2,04	65,83 ± 2,04	70,00 ± 3,16	67,22 ± 2,41 ^b
	B ₅	69,17 ± 3,76	69,17 ± 3,76	72,50 ± 4,18	70,28 ± 1,92 ^d
	Rataan	67,00 ± 1,41 ^a	68,50 ± 2,26 ^b	71,00 ± 2,00 ^c	
Setelah Pencairan Kembali	B ₁	40,83 ± 3,76	41,67 ± 2,58	46,67 ± 2,58	43,06 ± 3,16 ^a
	B ₂	43,33 ± 2,58	46,67 ± 2,58	49,17 ± 3,76	46,39 ± 2,93 ^c
	B ₃	47,50 ± 2,74	53,33 ± 4,08	55,00 ± 3,16	51,94 ± 3,94 ^e
	B ₄	41,67 ± 2,58	44,17 ± 4,92	47,50 ± 2,74	44,44 ± 2,92 ^b
	B ₅	45,00 ± 4,47	48,33 ± 2,58	51,67 ± 2,58	48,33 ± 3,34 ^d
	Rataan	43,67 ± 1,37 ^a	46,33 ± 2,50 ^b	50,00 ± 0,63 ^c	

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berbeda tidak nyata pada taraf uji 5% (kontras ortogonal)

A₁ = Tris sitrat,

A₂ = Laktosa,

A₃ = Susu skim

B₁ = Tanpa antioksidan,

B₂ = 0,1 g vitamin E

B₃ = 0,2 g vitamin E

B₄ = 0,1 g BHT

B₅ = 0,2 g BHT

Lampiran 2. Rataan Persentase Hidup Spermatozoa Domba St. Croix masing-masing Kombinasi Perlakuan pada Ketiga Tahap Pengolahan Semen (%)

Tahap Pengolahan	Anti-oksidaan	Jenis Pengencer			Rataan
		A ₁	A ₂	A ₃	
Setelah Pengenceran	B ₁	82,83 ± 2,48	84,67 ± 3,08	85,17 ± 2,40	84,22 ± 1,23 ^a
	B ₂	85,33 ± 3,01	85,33 ± 3,93	85,50 ± 3,83	85,39 ± 0,10 ^a
	B ₃	86,67 ± 1,03	86,67 ± 2,16	87,17 ± 2,32	86,83 ± 0,29 ^a
	B ₄	84,17 ± 3,97	83,50 ± 3,39	86,67 ± 1,97	84,78 ± 1,67 ^a
	B ₅	84,50 ± 3,02	86,83 ± 2,14	85,83 ± 0,98	85,72 ± 1,17 ^a
	Rataan	84,70 ± 1,55 ^a	85,40 ± 2,21 ^a	86,07 ± 1,61 ^a	
Setelah Ekuilibrasi	B ₁	72,00 ± 2,37	76,00 ± 3,10	77,00 ± 1,26	75,78 ± 2,65 ^a
	B ₂	77,50 ± 2,07	79,83 ± 2,04	79,17 ± 1,47	78,83 ± 1,20 ^c
	B ₃	80,00 ± 0,63	82,17 ± 2,32	82,50 ± 2,59	81,56 ± 1,36 ^e
	B ₄	76,50 ± 3,62	76,50 ± 1,52	78,67 ± 1,63	77,22 ± 1,25 ^b
	B ₅	78,33 ± 1,03	80,33 ± 1,86	79,67 ± 0,52	79,44 ± 1,02 ^d
	Rataan	76,87 ± 0,85 ^a	78,97 ± 0,73 ^b	79,40 ± 1,12 ^b	
Setelah Pencairan Kembali	B ₁	51,83 ± 3,76	55,00 ± 2,83	56,17 ± 3,97	54,33 ± 2,25 ^a
	B ₂	56,83 ± 3,54	59,17 ± 1,47	62,50 ± 2,74	59,50 ± 2,85 ^c
	B ₃	62,67 ± 3,56	64,50 ± 2,43	69,00 ± 2,53	65,39 ± 3,26 ^e
	B ₄	55,33 ± 1,97	56,17 ± 4,12	59,50 ± 2,88	57,00 ± 2,21 ^b
	B ₅	57,83 ± 1,94	60,33 ± 0,52	65,50 ± 2,26	61,22 ± 3,91 ^d
	Rataan	56,90 ± 2,15 ^a	59,03 ± 1,21 ^b	62,53 ± 2,20 ^c	

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berbeda tidak nyata pada taraf uji 5% (kontras ortogonal)

A₁ = Tris sitrat,

A₂ = Laktosa,

A₃ = Susu skim

B₁ = Tanpa antioksidan,

B₂ = 0,1 g vitamin E

B₃ = 0,2 g vitamin E

B₄ = 0,1 g BHT

B₅ = 0,2 g BHT

Penggunaan Vitamin E dan BHT dalam Pengencer Semen Beku Domba

Lampiran 3. Rataan Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Domba St. Croix masing-masing Kombinasi Perlakuan pada Ketiga Tahap Pengolahan Semen (%)

Tahap Pengolahan	Anti-oksidaan	Jenis Pengencer			Rataan
		A ₁	A ₂	A ₃	
Setelah Pengenceran	B ₁	82,50 ± 0,55	82,83 ± 2,40	84,00 ± 0,89	83,11 ± 0,79 ^a
	B ₂	83,00 ± 1,55	83,00 ± 1,55	83,67 ± 3,27	83,22 ± 0,39 ^a
	B ₃	84,00 ± 1,55	84,50 ± 2,43	84,83 ± 0,75	84,44 ± 0,42 ^a
	B ₄	82,00 ± 1,41	82,83 ± 3,43	84,83 ± 1,60	83,22 ± 1,45 ^a
	B ₅	84,17 ± 1,47	85,00 ± 1,41	84,00 ± 1,67	84,39 ± 0,54 ^a
	Rataan	83,13 ± 0,74 ^a	83,63 ± 1,09 ^a	84,27 ± 0,83 ^a	
Setelah Ekuilibrasi	B ₁	62,50 ± 2,07	66,33 ± 3,20	68,50 ± 5,79	65,78 ± 3,04 ^a
	B ₂	71,67 ± 3,14	72,50 ± 2,07	74,83 ± 3,54	73,00 ± 1,64 ^c
	B ₃	75,33 ± 1,21	76,17 ± 2,48	78,00 ± 2,45	76,50 ± 1,37 ^e
	B ₄	67,00 ± 2,68	70,00 ± 2,00	73,83 ± 3,19	70,28 ± 3,42 ^b
	B ₅	72,67 ± 2,42	74,00 ± 2,37	75,50 ± 4,09	74,06 ± 1,42 ^d
	Rataan	69,83 ± 0,71 ^a	71,80 ± 20,89 ^b	74,13 ± 3,02 ^c	
Setelah Pencairan Kembali	B ₁	46,33 ± 4,08	47,33 ± 5,32	51,83 ± 4,17	48,50 ± 2,93 ^a
	B ₂	51,00 ± 2,83	54,67 ± 3,56	58,67 ± 4,27	54,78 ± 3,84 ^c
	B ₃	56,50 ± 6,66	62,33 ± 2,42	65,00 ± 3,79	61,28 ± 4,35 ^e
	B ₄	50,50 ± 4,51	52,00 ± 3,90	55,83 ± 1,60	52,78 ± 2,75 ^b
	B ₅	54,33 ± 3,83	56,67 ± 2,07	60,17 ± 2,93	57,06 ± 2,94 ^d
	Rataan	51,73 ± 3,49 ^a	54,60 ± 1,91 ^b	58,30 ± 1,78 ^c	

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berbeza tidak nyata pada taraf uji 5% (kontras ortogonal)

A₁ = Tris sitrat,

A₂ = Laktosa

A₃ = Susu skim

B₁ = Tanpa antioksidan

B₂ = 0,1 g vitamin E

B₃ = 0,2 g vitamin E

B₄ = 0,1 g BHT

B₅ = 0,2 g BHT

Lampiran 4. Rataan Persentase Tudung Akrosom Utuh (TAU) Spermatozoa Domba St. Croix masing-masing Kombinasi Perlakuan pada Ketiga Tahap Pengolahan Semen (%)

Tahap Pengolahan	Anti-oksidaan	Jenis Pengencer			Rataan
		A ₁	A ₂	A ₃	
Setelah Pengenceran	B ₁	90,17 ± 1,47	89,83 ± 0,75	90,33 ± 1,21	90,11 ± 0,26 ^a
	B ₂	90,17 ± 0,98	90,83 ± 0,75	90,67 ± 0,82	90,56 ± 0,34 ^a
	B ₃	90,67 ± 0,82	91,33 ± 0,82	90,83 ± 1,47	90,94 ± 0,34 ^a
	B ₄	89,67 ± 0,82	90,17 ± 0,98	90,50 ± 0,84	90,11 ± 0,42 ^a
	B ₅	90,33 ± 1,03	90,67 ± 1,21	91,00 ± 1,26	90,67 ± 0,34 ^a
	Rataan	90,20 ± 0,25 ^a	90,57 ± 0,34 ^a	90,67 ± 0,27 ^a	
Setelah Ekuilibrasi	B ₁	76,83 ± 3,49	81,67 ± 22,73	81,67 ± 2,25	80,06 ± 2,79 ^a
	B ₂	83,00 ± 0,63	85,00 ± 0,89	85,67 ± 1,97	84,56 ± 1,39 ^c
	B ₃	85,83 ± 0,98	86,33 ± 1,03	88,50 ± 1,22	86,89 ± 1,42 ^e
	B ₄	82,50 ± 2,51	83,00 ± 3,41	84,17 ± 1,17	83,22 ± 0,86 ^b
	B ₅	84,33 ± 1,37	85,33 ± 1,03	86,50 ± 1,22	85,39 ± 1,09 ^d
	Rataan	82,50 ± 0,70 ^a	84,27 ± 1,37 ^b	85,30 ± 0,93 ^c	
Setelah Pencairan Kembali	B ₁	52,33 ± 5,01	50,83 ± 2,32	55,00 ± 3,03	52,72 ± 2,11 ^a
	B ₂	57,50 ± 2,43	59,33 ± 1,51	60,17 ± 2,48	59,00 ± 1,37 ^c
	B ₃	61,17 ± 2,64	64,67 ± 3,88	66,83 ± 2,23	64,22 ± 2,86 ^e
	B ₄	55,33 ± 2,58	56,67 ± 3,08	57,83 ± 1,94	56,61 ± 1,25 ^b
	B ₅	57,33 ± 3,61	61,83 ± 3,06	65,33 ± 2,80	61,50 ± 4,01 ^d
	Rataan	56,73 ± 2,27 ^a	58,67 ± 1,82 ^b	61,03 ± 0,64 ^c	

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berbeza tidak nyata pada taraf uji 5% (kontras ortogonal)

A₁ = Tris sitrat

A₂ = Laktosa

A₃ = Susu skim

B₁ = Tanpa antioksidan

B₂ = 0,1 g vitamin E

B₃ = 0,2 g vitamin E

B₄ = 0,1 g BHT

B₅ = 0,2 g BHT

Penggunaan Vitamin E dan BHT dalam Pengencer Semen Beku Domba

Lampiran 5. Rataan Kadar Malonaldehid (MDA) Spermatozoa Domba St. Croix setelah Ekuilibrasi dan Pencairan Kembali pada masing-masing Kombinasi Perlakuan (nmol/ml)

Tahap Pengolahan	Anti-oksidan	Jenis Pengencer			Rataan
		A ₁	A ₂	A ₃	
Setelah Ekuilibrasi	B ₁	6,31 ± 0,35	6,48 ± 0,43	6,42 ± 0,32	6,40 ± 0,09 ^e
	B ₂	2,66 ± 0,12	2,49 ± 0,32	2,66 ± 0,44	2,61 ± 0,10 ^c
	B ₃	2,45 ± 0,16	2,24 ± 0,23	2,20 ± 0,28	2,30 ± 0,13 ^a
	B ₄	2,85 ± 0,15	3,17 ± 0,30	2,63 ± 0,27	2,88 ± 0,27 ^d
	B ₅	2,55 ± 0,34	2,55 ± 0,52	2,32 ± 0,25	2,47 ± 0,13 ^b
	Rataan	3,36 ± 0,16 ^a	3,39 ± 0,09 ^a	3,25 ± 0,13 ^a	
Setelah Pencairan Kembali	B ₁	9,67 ± 0,39	9,77 ± 0,39	9,67 ± 0,35	9,70 ± 0,06 ^e
	B ₂	5,22 ± 0,18	5,28 ± 0,26	5,22 ± 0,33	5,24 ± 0,03 ^c
	B ₃	4,98 ± 0,13	4,76 ± 0,30	4,66 ± 0,34	4,80 ± 0,16 ^a
	B ₄	5,70 ± 0,16	5,75 ± 0,14	5,16 ± 0,39	5,54 ± 0,33 ^d
	B ₅	5,22 ± 0,39	4,89 ± 0,32	4,87 ± 0,25	4,99 ± 0,20 ^b
	Rataan	6,16 ± 0,09 ^c	6,10 ± 0,11 ^b	5,92 ± 0,14 ^a	

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berbeda tidak nyata pada taraf uji 5% (kontras ortogonal)

A₁ = Tris sitrat,

A₂ = Laktosa

A₃ = Susu skim

B₁ = Tanpa antioksidan

B₂ = 0,1 g vitamin E

B₃ = 0,2 g vitamin E

B₄ = 0,1 g BHT

B₅ = 0,2 g BHT