

Penambahan Alfa Tokoferol dalam Pengencer terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Pelung Pada Suhu 4°c

(THE ADDITION OF ALFA TOKOFEROL IN DILUENT OF MORTALITY AND VIABILITY OF SPERMATOZOEA PELUNG ROOSTER IN TEMPERATURE 4°C)

Melia Hendiyani¹, Wayan Bebas², Made Kota Budiasa²

¹Mahasiswa Profesi Dokter Hewan,
²Laboratorium Reproduksi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jl.P.B. Sudirman Denpasar Bali, Telp: 0361-223791
e-mail: melia.hendiyani@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi α -tocopherol pada pengencer fosfat kuning telur terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan. Masing-masing T0 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur tanpa ditambah α -tocopherol sebagai kontrol), T1 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur ditambah dengan α -tocopherol 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), T2 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur ditambah dengan α -tocopherol 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), T3 (semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur ditambah dengan α -tocopherol 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Masing-masing perlakuan terdiri dari 6 ulangan sehingga jumlah sampel yang digunakan sebanyak 24. Variabel yang diamati adalah motilitas dan daya hidup spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *General Linear Model (Multivariate)*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan α -tocopherol dalam pengencer fosfat kuning telur berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa ayam pelung. Konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ merupakan konsentrasi terbaik dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam.

Kata kunci: α -Tocopherol; ayam pelung;; daya hidup; motilitas; spermatozoa

ABSTRACT

The objective of this study was to determine different concentrations of α -tocopherol on egg yolk phosphate diluents motility and viability spermatozoa pelung rooster stored at 4°C for 24 hours. This study was used completely randomized design (RAL) with 4 treatments. Each T0 (cement diluted with egg yolk phosphate without added α -tocopherol as control), T1 (cement diluted with egg yolk phosphate with α -tocopherol 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$), T2 (cement diluted with egg yolk phosphate with α -tocopherol 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$), T3 (cement diluted with egg yolk phosphate with α -tocopherol 500 $\mu\text{g} / \text{ml}$). Each treatment consisted of 6 replications so that the number of samples used was 24. The observed variables were motility and viability of spermatozoa. The obtained were analyzed using the General Linear Model (Multivariate). The results showed that the addition of α -tocopherol in the yolk phosphate diluent significantly ($P < 0.05$) on motility and viability of pelung rooster spermatozoa. The concentration α -tocopherol 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ is the best concentration in maintaining the motility and viability of chicken spermatozoa stored at 4 ° C for 24 hours.

Keywords: α -tocopherol; motility; Pelung rooster; viability; spermatozoa

PENDAHULUAN

Keanekaragaman genetik plasma nutfah ayam lokal di Indonesia cukup melimpah dan sangat beragam. Salah satu plasma nutfah ayam lokal Indonesia adalah ayam pelung (Nataamijaya, 2005). Ayam pelung (*Gallus Gallus domesticus*) merupakan salah satu rumpun ayam lokal Indonesia, yang mempunyai keseragaman bentuk fisik dan komposisi genetik serta kemampuan adaptasi yang baik pada keterbatasan lingkungan (Keputusan Menteri Pertanian, 2011).

Darwati (2000), menyatakan produktivitas dan daya tetas ayam pelung di alam masih rendah, sehingga perlu upaya untuk memperbaikinya. Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu alternatif dalam upaya peningkatan produktivitas dan populasi ternak sehingga sangat berpotensi untuk memperbaiki genetik ayam lokal lain, serta dapat mengefisienkan penggunaan pejantan (Toelihere, 1993). Spermatozoa ayam bersifat unik, terdiri dari *poly unsaturated fatty acids* (PUFA) yang tinggi sehingga sangat mudah mengalami kerusakan akibat adanya peroksidasi berupa serangan radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS). Komposisi membran plasma sel spermatozoa berhubungan dengan tingkat kerentanan spermatozoa terhadap cekaman dingin (*cold shock*), terutama kandungan lipid (Tabatabaei *et al.*, 2011).

Selama proses penyimpanan, spermatozoa sering mengalami *cold shock* dan mengalami kerusakan oksidatif yang berdampak terhadap penurunan motilitas dan kesuburan. Oleh karena itu dalam proses penyimpanan semen perlu ditambahkan suatu bahan berupa antioksidan kedalam pengencer yang dapat menanggulangi radikal bebas (Herdis *et al.*, 2002).

Kuning telur mempunyai potensi untuk digunakan sebagai bahan pengencer, karena kandungan fraksi *low-density lipoprotein nya* (LDL) (Moussa *et al.*, 2002). Kuning telur dapat membantu sperma untuk menahan *cold shock*, mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa akibat pengerusakan oleh protein plasma semen, dan sangat menguntungkan selama penyimpanan sperma pada suhu dingin (Amirat, *et al.*, 2004; Bebas dan Gorda, 2016).

Penambahan antioksidan berperan penting dalam mempertahankan spermatozoa unggas selama proses penyimpanan dingin seperti yang dilaporkan Indrawati *et al.* (2013); astaxanthin mampu mempertahankan kualitas semen ayam kampung; Bebas *et al.* (2016), menambahkan kombinasi laktosa-astaxanthin untuk penyimpanan semen ayam hutan hijau; Trilaksana *et al.* (2015) menambahkan vitamin C pada semen kalkun.

Alpha-tocopherol merupakan salah satu bentuk vitamin E yang larut dalam lemak bersifat sebagai antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Vitamin E dengan efektif dapat menstabilkan lipid membran peroksida dalam selaput sel, berperan dalam mencegah peroksidasi lipid dan stres oksidatif spermatozoa. Bebas *et al.* (2016), mengatakan bahwa penambahan vitamin E (α -Tocopherol) dengan dosis 400 $\mu\text{g/ml}$ pada pengencer BTS merupakan dosis terbaik dalam mempertahankan daya hidup dan motilitasnya spermatozoa babi. Sampai saat ini penambahan vitamin E untuk mempertahankan kualitas semen ayam pelung belum pernah dilaporkan.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian mengenai penambahan α -tocopherol dalam pengencer fosfat kuning telur terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam pelung jantan yang berumur 8 bulan, α -tocopherol (Santa E[®]-Sanbe Farma), telur ayam, *aquadestilata*, *eosin negrosin sitrat*, etanol, alkohol 70%, antibiotika penicilin dan streptomycin, dan PBS (*Phosphat Buffer Saline granul, Sigma*). Alat yang digunakan yaitu mikroskop, kulkas, *object glass*, *cover glass*, pipet pasteur, cawan petri, tabung reaksi beserta rak, *beker glass*, kertas, spuit, *tabung erlenmeyer*, tisu, *aluminium foil*, gelas ukur, kompor listrik, kertas saring, dan mortil.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan, masing masing: Kelompok I (To): sebagai kontrol dengan menggunakan bahan pengencer fosfat kuning telur tanpa penambahan α -tocopherol. Kelompok II (T₁): Pengencer fosfat kuning telur ditambah α -tocopherol 300 $\mu\text{g/mL}$. Kelompok III (T₂): Pengencer fosfat kuning telur ditambah α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$. Kelompok IV (T₃): Pengencer fosfat kuning telur ditambah α -tocopherol 500 $\mu\text{g/mL}$.

Buffer fosfat dibuat dengan cara melarutkan 1 granul *buffer fosfat granul* kedalam 100 ml *aquadestilata*. Dilakukan pasteurisasi di atas kompor listrik selama 10 menit sambil dihomogenkan kemudian didinginkan.

Campurkan kuning telur kedalam larutan PBS dengan konsentrasi 10% kemudian dihomogenkan. Tambahkan antibiotik penicilin dan streptomycin masing-masing 1000 iu/mL dan 1000 $\mu\text{g/mL}$ pengencer kemudian dihomogenkan. Kemudian tambahkan α -tocopherol pada masing masing perlakuan sesuai dengan rancangan percobaan. Pengenceran semen dilakukan dengan konsentrasi $10 \times 10^6/\text{mL}$. Semen yang telah diencerkan disimpan pada

suhu 4°C selama 24 jam lalu dilakukan pengamatan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa.

Pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan menghomogenkan semen terlebih dahulu lalu diteteskan diatas *object glass* dan ditutup dengan *cover glass* selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop untuk melihat jumlah spermatozoa yang bergerak progresif. Ditentukan secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Toelihere, 1993).

Pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan *eosin negrosin sitrat* dengan cara semen diambil dan ditetes 1 tetes pada *object glass* kemudian diteteskan pewarna *eosin sitrat* sebanyak 2 tetes kemudian dihomogenkan. Selanjutnya dibuat preparat ulas dan dianginkan sampai kering, kemudian preparat diperiksa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali untuk menghitung jumlah spermatozoa masih hidup. Spermatozoa yang hidup akan terlihat transparan, sedangkan yang mati akan terwarnai merah.

Data yang diperoleh ditabulasikan dan dilakukan pengujian normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test*, dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene's Test*. Selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *analysis of variance (ANOVA)*, kemudian dilakukan pengujian statistik dengan menggunakan *General Linear Model (Multivariate)*. Bila terjadi perbedaan yang nyata diantara perlakuan maka dilakukan uji lanjutan menggunakan Uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian daya hidup spermatozoa akibat pengaruh penambahan vitamin E yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Pelung dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi α -Tocopherol

Parameter	Perlakuan			
	T0	T1	T2	T3
Motilitas (%)	56,17 \pm 1,472	64,50 \pm 1,049	73,17 \pm 1,472	70,00 \pm 1,265
Daya Hidup (%)	65,50 \pm 1,871	74,83 \pm 1,472	81,33 \pm 1,633	76,17 \pm 1,602

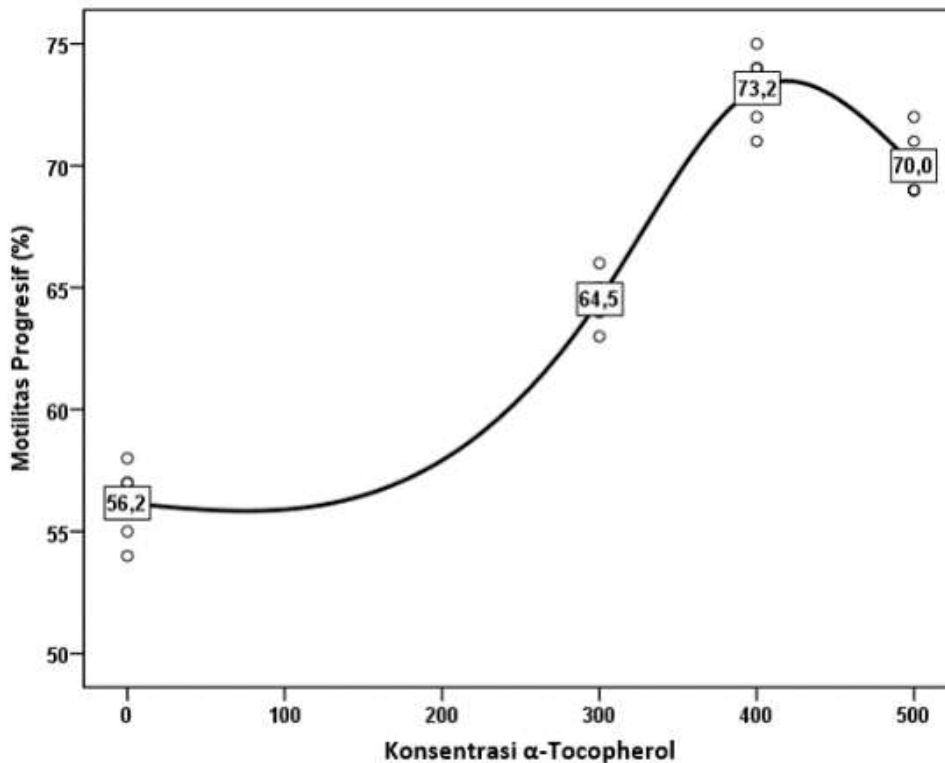
Berdasarkan analisis ragam yang dilakukan tampak bahwa penambahan berbagai konsentrasi α -tocopherol yang diencerkan dengan menggunakan fosfat kuning telur berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung. α -tocopherol merupakan salah satu antioksidan yang dapat memperlambat oksidasi lipid

melalui ikatan dengan oksigen, mengikat radikal bebas, menghambat katalis, stabilisasi hidroperoksid. Prinsip kerja antioksidan dalam menghambat oksidasi pada lemak yaitu: oksigen bebas diudara akan mengoksidasi ikatan rangkap pada asam lemak tidak jenuh, kemudian radikal bebas yang terbentuk akan bereaksi dengan oksigen sehingga akan menghasilkan peroksida aktif (Winarsi, 2007).

Apabila dalam suatu asam lemak tidak mengandung antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan ikatan rangkap lemak. Apabila ditambahkan antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan antioksidan tersebut sehingga radikal bebas dapat dihentikan dengan penambahan suatu antioksidan (Winarsi, 2007). α -Tocopherol sebagai antioksidan mempunyai kemampuan dalam menghambat terjadinya proses peroksidasi lipid akibat adanya radikal bebas (Beconi *et al.*, 1993).

Penambahan konsentrasi α -tocopherol 300 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, dan 500 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa ayam pelung. Motilitas spermatozoa ayam pelung pada pengencer fosfat kuning telur dengan konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$ nyata lebih baik diantara berbagai perlakuan penambahan α -tocopherol. Hal ini berarti α -tocopherol sangat aktif dalam mencegah peroksidasi lipid dengan menangkap peroksil lipid. α -tocopherol dapat mencegah peroksidasi lipid dengan cara memindahkan atom hidrogen ke radikal peroksil, saat metabolisme aerob yang tergantung pada elektron bebas sehingga menghasilkan ATP. Reaksi dengan oksigen dapat menghasilkan anion superoksidasi yang bila bereaksi kembali dengan molekul oksigen dapat menimbulkan kerusakan sel. Sel yang memiliki superoksidasi dismutase dan peroksidase dalam jumlah yang cukup dapat menghilangkan anion superoksida dan meminimalkan kerusakan peroksidatif (Hammerstedt, 1993).

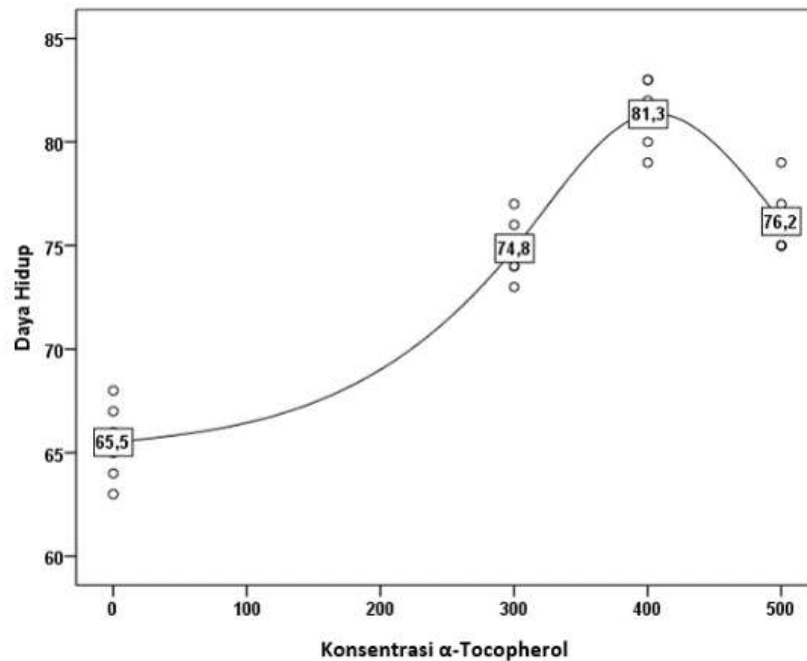
Grafik mengenai motilitas spermatozoa ayam pelung pada pengencer fosfat kuning telur dengan penambahan α -tocopherol yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 1. Grafik Motilitas Spermatozoa Ayam Pelung

Penambahan α -tocopherol dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda nyata ($P>0,05$) dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan penambahan konsentrasi 400 $\mu\text{g/mL}$ berbeda nyata ($P<0,05$) dengan konsentrasi 300 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$. Daya hidup spermatozoa ayam pelung dalam pengencer fosfat kuning telur dengan konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$ nyata lebih baik diantara berbagai perlakuan penambahan α -tocopherol. Hal ini disebabkan karena peranan vitamin E yang mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat radikal bebas hasil metabolisme spermatozoa, sehingga spermatozoa dapat bertahan hidup lebih lama dikarenakan kemampuan Vitamin E dalam menghambat terjadinya proses peroksidasi lipid sehingga membran plasma tetap utuh.

Grafik daya hidup spermatozoa ayam pelung pada pengencer fosfat kuning telur dengan penambahan α -tocopherol yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam dapat dilihat pada gambar dibawah ini:



Gambar 2. Grafik Daya Hidup Spermatozoa Ayam Pelung

Penambahan konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$ berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap konsentrasi α -tocopherol 300 $\mu\text{g/mL}$ dan 500 $\mu\text{g/mL}$ pada pengencer fosfat kuning telur. Konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan rata-rata motilitas dan daya hidup spermatozoa yang paling baik diantara berbagai perlakuan penambahan α -tocopherol. Hal ini berarti pemberian dosis tinggi antioksidan terhadap spermatozoa dapat menyebabkan α -tocopherol bertindak sebagai prooksidan. Apabila produksi radikal bebas meningkat ataupun produk antioksidan rendah juga dapat menyebabkan keseimbangan mengarah pada prooksidan sehingga menimbulkan stres oksidatif. Dampak dari stres oksidatif yaitu dapat menurunkan kuantitas sperma, penurunan motilitas spermatozoa dan meningkatkan sperma mati.

Penambahan vitamin E yang berlebihan dapat menyebabkan konsentrasi pengencer semakin pekat dan medium pengencer menjadi hipertonik. Peningkatan konsentrasi pada bahan pengencer menyebabkan spermatozoa kehilangan energi sehingga viabilitasnya menurun, karena terjadi kerusakan membran plasma dan metabolisme spermatozoa terhambat. Kondisi ini berakibat pada produksi energi untuk pergerakan berkurang, akhirnya

motilitas spermatozoa menurun, apabila kondisi berlangsung terus-menerus maka akan terjadi kematian spermatozoa (Hartono, 2008).

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$ pada pengencer fosfat kuning telur merupakan konsentrasi terbaik yang dapat digunakan untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Bebas *et al.* (2016), bahwa penambahan vitamin E (α -tocopherol) dan lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi. Dosis 400 $\mu\text{g/mL}$ pada pengencer BTS merupakan dosis terbaik dalam mempertahankan daya hidup dan motilitasnya spermatozoa babi.

SIMPULAN

Penambahan α -tocopherol dalam pengencer fosfat kuning telur berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa ayam pelung yang disimpan pada suhu 4°C. Konsentrasi α -tocopherol 400 $\mu\text{g/mL}$ merupakan konsentrasi terbaik yang dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui fertilitas inseminasi buatan pada semen yang diencerkan menggunakan fosfat kuning telur dengan penambahan α -tocopherol.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan memfasilitasi dalam proses penelitian di Laboratorium Reproduksi Veteriner Universitas Udayana, keluarga serta teman-teman seperjuangan yang telah membantu dalam proses penelitian dan penulisan.

DAFTAR PUSTAKA

- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L. 2004. Bull Semen in Vitro Fertility After Cryopreservation Using Egg Yolk LDL: a Comparison with Optidyl, a Commercial Egg Yolk Extender. *Theriogenology* 6(1): 895-907.
- Bebas W, GL Buyona, MK Budiasa. 2016. Penambahan Vitamin E Pada Pengencer BTS® Terhadap Daya Hidup Dan Motilitas Spermatozoa Babi Landrace Pada Penyimpanan 15°C. *Buletin Veteriner Udayana* 8(1): 1-7.

- Bebas W, Gorda W. 2016. Penambahan Astaxanthin pada Pengencer Kuning Telur Berbagai Jenis Unggas Dapat Memproteksi Semen Babi Selama Penyimpanan. *Jurnal Veteriner* 17(4): 484-491.
- Beconi MT, Frarcia CR, Mora NG, Affranchino MA. 1993. Effect of natural antioxidant on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 40: 841-851.
- Darwati. 2000. Produktivitas Ayam Kampung, Pelung, dan Resiprokalnya. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. *Med Pet.* 23(2): 32-35.
- Hartono M. 2008. Optimalisasi Penambahan Vitamin E dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur untuk Mempertahankan Kualitas Semen Kambing Boer. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 33(1): 11-19.
- Hammerstedt RH. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxydation. *J.Reprod. Fertil.* 5: 675-690.
- Herdis, Kusuma I, Surachman M, Riza M, Utama IK, Inounu I, Purwantara B, Arifiantini I. 2002. Peningkatan Kualitas Semen Beku Domba Garut melalui Penambahan α -Tokoferol ke dalam Pengencer Susu-Skim Kuning Telur. *JITV* 7(1): 12-17.
- Indrawati D, Bebas W, Trilaksana IGNB. 2013. Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Kampung dengan Penambahan Astaxanthin pada Suhu 3–5° C. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(4): 445 -452.
- Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia. 2011. *Rumpun Ayam Pelung Nomor 2918/Kpts/OT.140/6/2011*. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A. 2002. Low Density Lipoproteins Extracted from hen Egg Yolk by an Easy Method: Cryoprotective Effect on Frozen-thawed Bull Semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Nataamijaya AG. 2005. Karakteristik Penampilan Pola Warna Bulu, Kulit, Sisik Kaki, dan Paruh Ayam Pelung di Garut dan Ayam Sentul di Ciamis. *Buletin Plasma Nutfah.* 11(1): 1-5.
- Tabatabaei S, Roozali B, Esmail. 2011. Effects of Vitamin E Addition to Chicken Semen on Sperm Quality During in Vitro Storage of Semen. *Veterinary Research Forum.* 2(2): 103-11.
- Toelihar MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: CV Angkasa.
- Trilaksana IGNB, Ndun RN, Bebas W. 2015. Penambahan Vitamin C Pada Pengencer Fosfat Kuning Telur Semen Kalkun Yang Disimpan Pada Suhu 5° C. *Buletin Veteriner Udayana* 7(2): 186-193.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas: Potensi dan aplikasi dalam kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.