

Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Sapi Persilangan yang Dipreservasi dengan Air Kelapa Muda pada Suhu 5°C

(*VIABILITY OF EPIDIDYMAL SPERMATOZOA CROSSBREED CATTLE
PRESERVED WITH COCONUT WATER AT 5°C*)

Muhammad Rizal^{1*}, Muhammad Riyadhhi¹,
Bambang Irawan¹, Anis Wahdi¹, Habibah¹, Herdis²

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat,
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36, Banjarbaru, Kalimantan Selatan, Indonesia 70714.
Telp. 0511-4781551. *Email: icang65@yahoo.com

²Pusat Teknologi Produksi Pertanian,
Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, LAPTIAB, Serpong

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas air kelapa muda dengan berbagai konsentrasi kuning telur ayam ras dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis sapi persilangan yang dipreservasi pada suhu 5°C. Sebanyak lima pasang testis beserta epididimis sapi persilangan diperoleh dari rumah pemotongan hewan digunakan dalam penelitian. Spermatozoa dikoleksi dengan metode bilas-tekan pada jaringan *cauda* epididimis menggunakan NaCl fisiologis (0,9% NaCl). Spermatozoa dibagi ke dalam empat buah tabung dengan volume yang sama dan masing-masing diencerkan dengan perlakuan: pengencer laktosa yang mengandung 20% kuning telur (kontrol), 90% air kelapa muda + 10% kuning telur (AKKT10), 85% air kelapa muda + 15% kuning telur (AKKT15), dan 80% air kelapa muda + 20% kuning telur (AKKT20). Spermatozoa yang telah diencerkan dipreservasi di dalam lemari es pada suhu 5°C. Kualitas spermatozoa meliputi persentase spermatozoa motil (SM), spermatozoa hidup (SH), dan membran plasma utuh (MPU) dievaluasi setiap hari selama empat hari. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan setiap perlakuan terdiri dari lima ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rataan konsentrasi spermatozoa, SM, SH, persentase spermatozoa abnormal, dan MPU spermatozoa epididimis segar sapi persilangan masing-masing adalah 1.414 juta sel/mL, 72%, 85%, 9%, dan 90%. Pada hari keempat preservasi, persentase SM, SH, dan MPU kontrol (43,0; 52,2; 59,2%) dan AKKT20 (42,0; 52,0; 59,0%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan AKKT10 (33,0; 45,4; 52,8%) dan AKKT15 (37,0; 50,0; 54,6%). Dapat disimpulkan bahwa pengencer laktosa dan AKKT20 mampu mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis sapi persilangan selama tiga hari preservasi pada suhu 5°C dan layak digunakan dalam program inseminasi buatan, sedangkan perlakuan AKKT10 dan AKKT15 selama dua hari.

Kata-kata kunci: air kelapa muda; preservasi; spermatozoa epididimis; sapi persilangan

ABSTRACT

The objective of this research was to examine the effectiveness of coconut water with various egg yolk concentrations in maintaining the viability of epididymal spermatozoa of crossbreed cattle preserved at 5°C. Five testis with epididymides of crossbreed cattle were obtained from slaughterhouse. Epididymal spermatozoa was collected by the combination of slicing, flushing and tissues pressure methods of cauda epididymides with saline solution (0.9% NaCl). Collected-spermatozoa was equally divided in volume into four tubes and diluted with lactose extender containing 20% egg yolk (control), 90% coconut water + 10% egg yolk (CWEY10), 85% coconut water + 15% egg yolk (CWEY15), and 80% coconut water + 20% egg yolk (CWEY20), respectively. Diluted-spermatozoa was stored in refrigerator at 5°C. Quality of diluted-spermatozoa including percentages of motile spermatozoa (MS), live spermatozoa (LS), spermatozoa with intact plasma membrane (IPM) were evaluated every day during four days of storage. Data were analyzed by using completely randomized design with four treatments and five replicates. Means were

compared with significant difference test at 0.05 significant level. Results of this study showed that mean of spermatozoa concentration, percentage of MS, percentage of LS, percentage of spermatozoa abnormal, and percentage of IPM of crossbreed cattle fresh epididymal spermatozoa were 1,414 million cell/ml, 72%, 85%, 9%, and 90%, respectively. At day-4 of the storage, percentages of MS, LS, and IPM of control (43, 52.2, 59.2%) and CWEY20 (42, 52, 59%) were significantly ($P < 0.05$) higher than CWEY10 (33, 45.4, 52.8%) and CWEY15 (37, 50, 54.6%). In conclusion, lactose and CWEY20 extenders could be maintaining the quality of epididymal spermatozoa of crossbreed cattle for three days preservation at 5°C and two days for CWEY10 and CWEY15.

Keywords: coconut water; preservation; epididymal spermatozoa; crossbreed cattle

PENDAHULUAN

Sapi persilangan merupakan hasil persilangan antara sapi lokal Indonesia dan sapi impor jenis sapi potong, yang di daerah Kalimantan Selatan lebih dikenal dengan nama sapi kisar. Peternak di beberapa daerah di Kalimantan Selatan senang memelihara sapi kisar tersebut karena memiliki performans yang baik. Kondisi fisik sapi kisar umumnya lebih besar daripada sapi lokal, dan mampu beradaptasi dengan baik terhadap kondisi lingkungan Kalimantan Selatan, sehingga berpotensi untuk dikembangkan menjadi suatu peternakan komersial. Peningkatan produktivitas sapi persilangan ini dapat dipercepat dengan penerapan berbagai teknologi di bidang peternakan yang telah berkembang dengan pesat, mulai dari teknologi pakan hingga reproduksi. Khusus untuk teknologi reproduksi, pada saat ini, inseminasi buatan (IB) merupakan teknologi yang tepat untuk diterapkan pada peternakan. Inseminasi buatan merupakan teknologi yang dapat mengatasi keterbatasan jumlah pejantan unggul, serta kapasitas reproduksi pejantan dapat dimanfaatkan secara maksimal.

Selama ini dalam aplikasi teknologi IB umumnya spermatozoa yang dimanfaatkan adalah merupakan hasil ejakulasi yang ditampung dengan vagina buatan. Ada alternatif lain yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber spermatozoa, yaitu spermatozoa asal *cauda* epididimis. *Cauda* epididimis merupakan tempat penyimpanan spermatozoa sebelum diejakulasikan (Toelihere, 1993). Spermatozoa yang terdapat pada *cauda* epididimis merupakan spermatozoa yang sudah matang karena telah mengalami proses pematangan pada bagian *caput* dan *corpus epididimis* (Toelihere, 1993; Hafez, 2000). Menurut Rizal (2004) upaya pengolahan spermatozoa yang dikoleksi dari epididimis dalam bentuk semen cair atau semen beku untuk keperluan aplikasi berbagai

teknologi reproduksi, menjadi metode alternatif yang dapat diterapkan pada ternak atau hewan yang memiliki kualitas genetik unggul tetapi tidak dapat ditampung semennya. Selanjutnya dinyatakan bahwa metode ini juga menjadi alternatif dalam upaya penyelamatan plasma nutfah ternak atau hewan jantan yang mati secara mendadak serta hewan-hewan langka dan buas.

Hingga saat ini yang lazim dimanfaatkan sebagai komponen pengencer semen adalah senyawa-senyawa kimia sintetik. Senyawa kimia tersebut umumnya berharga cukup mahal dan tidak mudah diperoleh di daerah-daerah tertentu, karena merupakan produk impor. Indonesia sebagai negara tropis sebenarnya memiliki berbagai macam sumber daya alam yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan pengencer semen. Pemanfaatan berbagai bahan pengencer alternatif berbahan alami telah dilaporkan, seperti air kelapa muda pada semen kerbau belang (Toelihere, 1993), semen domba priangan (Qomariyah *et al.*, 2001), dan semen domba garut (Rizal *et al.*, 2006); nira aren pada semen kerbau rawa (Rizal dan Riyadhhi, 2016); ekstrak buah melon dan wortel pada semen domba garut (Yulnawati *et al.*, 2005) dan spermatozoa epididimis sapi bali (Parera *et al.*, 2009); dan air buah lontar pada semen sapi bali (MataHine *et al.*, 2014). Bahan-bahan tersebut diperkaya dengan berbagai komponen tambahan seperti kuning telur, antibiotik (Akhter *et al.*, 2007; Kulaksiz *et al.*, 2010) sehingga terbentuk suatu pengencer semen yang lengkap dan dapat memenuhi kebutuhan spermatozoa selama preservasi, terutama saat preservasi pada suhu rendah.

Pada penelitian ini dilakukan preservasi spermatozoa *cauda* epididimis sapi persilangan menggunakan pengencer air kelapa muda yang dikombinasikan dengan beberapa konsentrasi kuning telur ayam ras. Tujuan penelitian dengan materi spermatozoa *cauda* epididimis sapi persilangan yang diencerkan dengan bahan

alami ini adalah untuk mengetahui daya hidup spermatozoa dalam pengencer tersebut selama preservasi pada suhu 5°C, sehingga masih layak digunakan dalam program IB.

METODE PENELITIAN

Koleksi Testis dan Penyiapan Pengencer

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru. Testis beserta epididimis sapi persilangan diperoleh di rumah pemotongan hewan (RPH) Basirih, Banjarmasin. Testis dan epididimis yang masih terbungkus oleh *scrotum* ditranspor ke laboratorium tanpa perlakuan khusus.

Pengencer dasar laktosa terdiri atas: 9 g laktosa dan 1,37 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Pengencer laktosa lengkap terdiri atas: 80% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras + antibiotik (1.000 µg penisilin dan 1.000 IU streptomisin setiap mililiter pengencer).

Pengencer air kelapa muda disiapkan dengan cara menyedot air kelapa menggunakan pipet steril langsung dari dalam batok kelapa muda. Pengencer air kelapa muda terdiri atas: air kelapa muda + kuning telur ayam ras + antibiotik (1.000 µg penisilin dan 1.000 IU streptomisin setiap mililiter pengencer). Persentase air kelapa muda dan kuning telur ayam ras sesuai dengan perlakuan.

Koleksi dan Pengenceran Spermatozoa

Spermatozoa dikoleksi dengan kombinasi teknik *slicing*, pembilasan, dan penekanan (bilas-tekan) pada setiap jaringan *cauda epididimis* (Rizal, 2004) menggunakan larutan NaCl fisiologis hingga mencapai volume 2,5 mL. Spermatozoa hasil koleksi dievaluasi kualitasnya menggunakan mikroskop cahaya untuk menentukan kelayakan spermatozoa diproses lebih lanjut.

Spermatozoa hasil koleksi dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dengan volume yang sama, kemudian diencerkan sesuai dengan perlakuan. Perlakuan tersebut adalah: 80% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras (kontrol), 90% air kelapa muda + 10% kuning telur ayam ras (AKKT10), 85% air kelapa muda + 15% kuning telur ayam ras (AKKT15), dan 80% air kelapa muda + 20% kuning telur ayam ras (AKKT20). Spermatozoa

diencerkan hingga konsentrasi 15 juta spermatozoa motil per milliliter.

Seluruh tabung reaksi yang berisi spermatozoa yang telah diencerkan sesuai dengan perlakuan ditutup rapat kemudian dimasukkan ke gelas piala yang berisi air bersih dan disimpan di dalam refrigerator lemari es pada suhu sekitar 5°C. Contoh masing-masing perlakuan dievaluasi kualitasnya setiap hari hingga persentase spermatozoa motil 40% (berdasarkan SNI 4869.1:2008).

Variabel Kualitas Spermatozoa yang Dievaluasi

Kualitas spermatozoa dievaluasi pada tahap setelah koleksi (spermatozoa segar) serta setelah pengenceran dan preservasi. Kualitas spermatozoa yang dievaluasi pada tahap spermatozoa segar adalah: konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, persentase spermatozoa abnormal, dan persentase membran plasma utuh (MPU). Kualitas spermatozoa yang dievaluasi setelah pengenceran dan preservasi adalah: persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase MPU.

Persentase spermatozoa motil adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Variabel ini dievaluasi secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan pewarnaan eosin-nigrosin (Felipe-Perez *et al.*, 2008). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Dalam hal ini sebanyak 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Persentase MPU dievaluasi dengan metode *osmotic resistance test* (ORT) (Revell dan Mrode, 1994). Komposisi larutan hiposmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 mL larutan hiposmotik ditambahkan dengan 20 mL semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian dievaluasi dengan bantuan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali

terhadap 200 spermatozoa yang diamati. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

Analisis Data

Rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan setiap perlakuan terdiri dari lima ulangan digunakan dalam penelitian ini, dan data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Spermatozoa Segar Epididimis Sapi Persilangan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata konsentrasi spermatozoa epididimis sapi persilangan adalah 1.414 juta sel/mL, rata-rata persentase spermatozoa motil adalah 72%, rata-rata persentase spermatozoa hidup adalah 85%, rata-rata persentase spermatozoa abnormal adalah 9%, dan rata-rata persentase MPU adalah 90% (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa yang dikoleksi dari *cauda* epididimis sapi persilangan memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut, baik berupa semen cair maupun semen beku. Semen segar yang baik, harus memiliki persentase spermatozoa motil di atas 70% dan persentase spermatozoa normal di atas 80% (Swellum *et al.*, 2011), dan persentase MPU di atas 60% (Revell dan Mrode, 1994).

Rataan konsentrasi spermatozoa yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 1.414 juta sel/mL. Solihati *et al.* (2008) melaporkan bahwa rata-rata konsentrasi spermatozoa *cauda*

epididimis sapi persilangan ongol (PO) 5.053,3 juta sel/mL. Konsentrasi spermatozoa *cauda* epididimis pada hewan mamalia dilaporkan sebesar 10.000–50.000 juta sel/mL (Senger, 1999). Konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya karena penghitungan konsentrasi dilakukan setelah proses pembilasan dengan larutan NaCl fisiologis.

Rataan persentase spermatozoa motil yang diperoleh pada penelitian ini adalah 72%. Solihati *et al.* (2008) melaporkan persentase spermatozoa motil sebesar 70–75% pada spermatozoa segar epididimis sapi PO. Persentase spermatozoa motil pada spermatozoa epididimis kerbau belang rata-ratanya adalah 65% (Yulnawati *et al.*, 2008). Persentase spermatozoa hidup asal *cauda* epididimis sapi persilangan pada penelitian ini rata-ratanya adalah 85% (2–88%). Hasil yang kurang lebih sama dilaporkan Solihati *et al.* (2008) yaitu 84,16% pada spermatozoa asal *cauda* epididimis sapi PO. Yulnawati *et al.* (2008) melaporkan rata-rata persentase spermatozoa hidup pada *cauda* epididimis kerbau belang adalah 79,3%.

Persentase spermatozoa abnormal yang diperoleh dalam penelitian ini rata-rata 9% (kisaran 7–11%). Persentase spermatozoa abnormal asal *cauda* epididimis sapi PO rata-ratanya adalah 9,33% (Solihati *et al.*, 2008) dan 15% pada kerbau belang (Yulnawati *et al.*, 2008). Abnormalitas yang terdapat pada spermatozoa asal *cauda* epididimis sapi persilangan dalam penelitian ini masih berada dalam kisaran normal dan dapat digunakan untuk proses selanjutnya. Menurut Hafez (2000) angka morfologi abnormal 8–10% tidak memberikan pengaruh yang cukup berarti bagi fertilitas. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata persentase MPU adalah 90% (88–92%). Peneliti sebelumnya melaporkan persentase MPU yang lebih rendah pada spermatozoa epididimis kerbau belang, yakni 80,8% (Yulnawati *et al.*, 2008).

Kualitas Spermatozoa Epididimis Selama Preservasi pada Suhu 5°C

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa terjadi penurunan kualitas spermatozoa yang meliputi spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU mulai dari hari pertama hingga hari kelima preservasi (Tabel 2, 3, dan 4). Hal ini diduga karena selama preservasi proses metabolisme tetap berjalan, dan menghasilkan

Tabel 1. Karakteristik spermatozoa segar cauda epididimis sapi persilangan

Unsur	Rataan ± SD
Konsentrasi spermatozoa (juta/mL)*	1.414,00 ± 181,05
Spermatozoa motil (%)	72,00 ± 2,74
Spermatozoa hidup (%)	85,00 ± 2,24
Spermatozoa abnormal (%)	9,00 ± 1,58
Membran plasma utuh (%)	90,00 ± 1,58

Keterangan: *Setelah ditambahkan NaCl fisiologis hingga volume 2,5 mL.

Tabel 2. Rataan persentase spermatozoa motil selama preservasi pada suhu 5°C

Perlakuan	Penyimpanan hari ke-				
	1	2	3	4	5
Kontrol	72,00 ± 2,74	65,00 ± 0,00	48,00 ± 4,47 ^b	43,00 ± 4,47 ^c	34,00 ± 2,24 ^d
AKKT10	72,00 ± 2,74	65,00 ± 0,00	43,00 ± 2,74 ^a	33,00 ± 4,47 ^a	19,00 ± 2,24 ^a
AKKT15	72,00 ± 2,74	65,00 ± 0,00	44,00 ± 2,24 ^{ab}	37,00 ± 4,47 ^b	24,00 ± 2,24 ^b
AKKT20	72,00 ± 2,74	65,00 ± 0,00	48,00 ± 2,74 ^b	42,00 ± 2,74 ^c	31,00 ± 4,18 ^c

Keterangan: ^{a,b,c,d}Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Kontrol = 80% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras

AKKT10 = 90% air kelapa muda + 10% kuning telur ayam ras

AKKT15 = 85% air kelapa muda + 15% kuning telur ayam ras

AKKT20 = 80% air kelapa muda + 20% kuning telur ayam ras.

Tabel 3. Rataan persentase spermatozoa hidup selama preservasi pada suhu 5°C

Perlakuan	Penyimpanan hari ke-				
	1	2	3	4	5
Kontrol	85,00 ± 2,24	79,60 ± 1,60	64,20 ± 3,31 ^b	52,20 ± 2,79 ^b	44,20 ± 3,35 ^c
AKKT10	85,00 ± 2,24	79,80 ± 2,86	58,60 ± 3,26 ^a	45,40 ± 1,41 ^a	33,40 ± 2,07 ^a
AKKT15	85,00 ± 2,24	79,40 ± 1,83	59,20 ± 3,08 ^a	50,40 ± 4,37 ^b	36,60 ± 2,41 ^b
AKKT20	85,00 ± 2,24	80,40 ± 1,94	60,20 ± 4,15 ^a	52,00 ± 3,33 ^b	42,40 ± 4,28 ^c

Keterangan: ^{a,b,c}Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Kontrol = 80% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras

AKKT10 = 90% air kelapa muda + 10% kuning telur ayam ras

AKKT15 = 85% air kelapa muda + 15% kuning telur ayam ras

AKKT20 = 80% air kelapa muda + 20% kuning telur ayam ras.

Tabel 4. Rataan persentase MPU spermatozoa selama preservasi pada suhu 5°C

Perlakuan	Penyimpanan hari ke-				
	1	2	3	4	5
Kontrol	90,00 ± 1,58	76,40 ± 3,35	67,00 ± 2,35 ^b	59,20 ± 2,35 ^b	46,20 ± 1,30 ^c
AKKT10	90,00 ± 1,58	76,80 ± 2,07	63,80 ± 2,28 ^a	52,80 ± 2,88 ^a	38,60 ± 3,51 ^a
AKKT15	90,00 ± 1,58	77,20 ± 2,41	64,40 ± 2,07 ^a	54,60 ± 2,07 ^a	41,40 ± 3,05 ^b
AKKT20	90,00 ± 1,58	77,00 ± 4,28	66,60 ± 2,07 ^b	59,00 ± 2,07 ^b	46,00 ± 2,00 ^c

Keterangan: ^{a,b,c}Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Kontrol = 80% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras

AKKT10 = 90% air kelapa muda + 10% kuning telur ayam ras

AKKT15 = 85% air kelapa muda + 15% kuning telur ayam ras

AKKT20 = 80% air kelapa muda + 20% kuning telur ayam ras.

produk berupa asam laktat dan radikal bebas yang justru merugikan bagi spermatozoa. Proses preservasi dalam penelitian berlangsung secara anaerob (tanpa oksigen) yang hasil akhir metabolisme adalah asam laktat. Penimbunan asam laktat selama preservasi menyebabkan menurunnya derajat keasaman (pH) pengencer. Menurut Toelihere (1993) pH sangat memengaruhi daya tahan hidup spermatozoa. Selanjutnya dinyatakan bahwa pH normal semen kerbau adalah netral. Penurunan atau peningkatan pH eksternal yang selanjutnya memodifikasi pH intraseluler dapat memengaruhi motilitas spermatozoa (Contri *et al.*, 2013).

Beberapa studi menunjukkan bahwa pH memengaruhi motilitas spermatozoa, dan penurunan pH dapat menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa sapi (Jones dan Bavister, 2000). Hubungan antara pH intraseluler dan motilitas berkenaan dengan fosforilasi protein (Carr dan Acott, 1989). Inkubasi spermatozoa dalam medium yang mengandung asam laktat lemah menyebabkan perubahan pH internal spermatozoa sebagai akibat perubahan pH ekstraseluler. Perubahan (naik atau turun) pH eksternal dapat memodifikasi pH intraseluler spermatozoa, sehingga memengaruhi motilitas dan integritas membran plasma sel (Contri *et al.*, 2013). Semen yang disimpan pada suhu dingin akan meningkatkan jumlah spermatozoa yang rusak, menipisnya sumber energi yang tersedia di dalam pengencer, dan bertambahnya umur spermatozoa yang menyebabkan menurunnya daya hidup spermatozoa tersebut (Hunter *et al.*, 2011; Shum *et al.*, 2011).

Menurut Arifiantini dan Purwantara (2010) motilitas dan daya hidup spermatozoa berhubungan dengan keutuhan membran plasma sel. Hal ini karena membran plasma sel berperan ganda, yakni melindungi organel-organel sel dari perusakan secara mekanik dan secara biokemik mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Jika terjadi kerusakan pada membran plasma sel bagian tengah spermatozoa, maka enzim aspartat aminotransferase (AspAT) akan keluar dari dalam sel. Hal ini menyebabkan terganggunya proses metabolisme, karena enzim AspAT merupakan enzim mitokondria utama dalam produksi adenosin trifosfat (ATP). Pada preservasi suhu dingin, kerja enzim ATP-*ase-linked sodium-potassium pump* juga akan

terganggu yang menyebabkan terjadinya kebocoran ion, dan berakibat menurunnya motilitas spermatozoa (Colenbrander *et al.*, 1992).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa secara umum persentase spermatozoa motil (Tabel 2), spermatozoa hidup (Tabel 3), dan MPU (Tabel 4) pada perlakuan laktosa dan AKKT20 nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan AKKT10 dan AKKT15 mulai dari hari kedua hingga hari kelima preservasi. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi antara 80% air kelapa muda dan 20% kuning telur memiliki kemampuan yang sama dengan bahan kimiawi sintetik (laktosa) dalam melindungi spermatozoa epididimis sapi persilangan selama preservasi pada suhu 5°C.

Air kelapa muda sebagai pengencer semen telah dilaporkan digunakan pada berbagai jenis ternak, seperti pada kerbau belang (Toelihere, 1993), domba priangan (Qomariyah *et al.*, 2001), dan domba garut (Rizal *et al.*, 2006). Menurut Yong *et al.* (2009) air kelapa mengandung karbohidrat terutama glukosa, fruktosa, dan sukrosa, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Pergerakan (motilitas) spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme karbohidrat (Mukai dan Okuno, 2004).

Pengencer laktosa merupakan perlakuan terbaik dalam penelitian ini diduga karena laktosa berperan sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari proses perusakan akibat pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) selama penyimpanan pada suhu rendah (3–5°C). Hal ini ditandai oleh tingginya persentase MPU dibandingkan dengan perlakuan lainnya, mulai dari hari ketiga hingga kelima preservasi (Tabel 4). Menurut White (1993) pengaruh kejutan dingin berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma sel, yakni perubahan bentuk dari cair ke gel yang terjadi pada suhu di bawah 20°C. Perubahan tatanan rantai asam lemak dan protein pada membran plasma menyebabkan kebocoran atau selektivitas membran plasma sel rusak, yang menyebabkan ion-ion seperti ion kalsium bebas masuk ke sel. Oleh karena itu, preservasi spermatozoa pada suhu yang mendekati 0°C diperlukan zat pelindung di dalam pengencer, seperti fosfolipid kuning telur dan krioprotektan, serta proses pendinginan harus dilakukan secara bertahap (Kayser *et al.*, 1992).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum kadar kuning telur ayam berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa, dan kadar kuning telur sebanyak 20% lebih baik dibandingkan dengan 10 dan 15%. Penggunaan kuning telur sebanyak 20% dalam proses preservasi semen juga dilaporkan pada proses kriopreservasi spermatozoa epididimis kerbau (Barati *et al.*, 2009). Hal ini menunjukkan bahwa kadar kuning telur sebanyak 10 dan 15% belum cukup untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk suhu rendah berupa cekaman dingin (*cold shock*) selama preservasi di dalam *refrigerator* lemari es. Pengaruh buruk cekaman dingin terhadap spermatozoa selama preservasi pada suhu rendah tidak dapat dihindari, tetapi akibat yang ditimbulkan dapat diminimalisir dengan cara menambahkan komponen tertentu ke dalam pengencer semen (Junior *et al.*, 2009). Menurut Woelders *et al.* (1997) kuning telur ayam merupakan salah satu bahan yang dapat ditambahkan ke dalam pengencer semen dengan tujuan meminimalkan akibat negatif yang ditimbulkan pada spermatozoa selama preservasi pada suhu rendah. Substansi terpenting yang diperlukan di dalam kuning telur ayam terkait dengan upaya melindungi spermatozoa selama preservasi, terutama preservasi pada suhu rendah adalah fosfolipid berupa lesitin (fosfatidil kolin) dan kolesterol. Kuning telur mengandung *low-density lipoprotein* (LDL), khususnya fosfolipid yang telah diidentifikasi sebagai komponen efektif dalam melindungi spermatozoa terhadap pengaruh pendinginan yang cepat (Parks dan Graham, 1992), dan mencegah peningkatan aliran ion kalsium yang berlebihan ke dalam sel yang dapat merusak spermatozoa (White, 1993). *Low-density lipoprotein* yang terkandung di dalam kuning telur akan berikatan dengan membran plasma sel spermatozoa sehingga membentuk selaput antara asam lemak dan air (Bergeron *et al.*, 2004), dan menggantikan fosfolipid dan kolesterol di dalam membran plasma sel spermatozoa jika terjadi kerusakan selama preservasi sehingga membran plasma sel tetap dapat berfungsi dengan baik (Manjunath *et al.*, 2002). Lesitin yang merupakan bagian LDL juga berperan sebagai senyawa krioprotektan yang berfungsi melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan selama preservasi semen pada suhu rendah (Moussa *et al.*, 2002) dengan cara menahan hilangnya fosfolipid membran plasma

sel spermatozoa pada kondisi *cold shock* (Junior *et al.*, 2009).

Perlakuan laktosa dan AKKT20 mampu mempreservasi spermatozoa epididimis sapi persilangan pada suhu 5°C hingga tiga hari dan masih layak digunakan dalam program IB, karena memiliki persentase spermatozoa motil masing-masing sebesar 43 dan 42%. Perlakuan AKKT10 dan AKKT15 mampu mempertahankan persentase spermatozoa motil di atas 40% selama dua hari. Berdasarkan SNI 4869.1: 2008, semen sapi yang memenuhi syarat digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil di atas 40%.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian dapat disimpulkan bahwa spermatozoa segar yang dikoleksi dari *cauda* epididimis sapi persilangan memenuhi syarat kualitas untuk dipreservasi. Perlakuan pengencer laktosa dan AKKT20 mampu mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis sapi persilangan yang layak digunakan dalam program IB selama tiga hari preservasi pada suhu 5°C, sedangkan perlakuan AKKT10 dan AKKT15 selama dua hari.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan agar memanfaatkan spermatozoa *cauda* epididimis sapi unggul yang telah dipotong atau mati sebagai salah satu alternatif sumber spermatozoa, dan menggunakan bahan alami seperti air kelapa muda sebagai komponen utama pengencer semen.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhter S, Sajjad M, Andrabi SMH, Ullah N, Qayyum M. 2007. Effect of antibiotics in extender on fertility of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Vet J* 27: 13-16.
- Arifiantini RI, Purwantara B. 2010. Motility and viability of friesian holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *J Indonesian Trop Anim Agric* 35: 222-226.
- Barati F, Khaksary M, Mohammadi Gh. 2009. Cryopreservation of in situcool stored buffalo

- (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iranian J Vet Res* 10: 339-345.
- Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 70: 708-717.
- Carr DW, Acott TS. 1989. Intracellular pH regulates bovine sperm motility and protein phosphorylation. *Biol Reprod* 41: 907-920.
- Colenbrander B, Fazeli AR, van Buiten A, Parlevliet J, Gadella BM. 1992. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Vet Scand* (Suppl) 88: 49-58.
- Contri A, Gloria A, Robbe D, Valorz C, Wegher L, Carluccio A. 2013. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci* 136: 252-259.
- Felipe-Perez YE, Juarez-Mosqueda ML, Hernandez-Gonzalez EO, Valencia JJ. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Vet Bras* 2: 123-130.
- Hafez ESE. 2000. Anatomy of male reproduction, in *Reproduction in Farm Animals* 7th Edition Hafez, ESE, Hafez B (editors). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. Hlm. 3-12.
- Hunter RH, Coy P, Gadea J, Rath D. 2011. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet* 28: 191-197.
- Jones JM, Bavister BD. 2000. Acidification of intracellular pH in bovine spermatozoa suppresses motility and extends viable life. *J Androl* 21: 616-624.
- Junior AS, Corcini VCD, Ulguim RR, Alvarenga MVF, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia Jr T, Deschamps JC. 2009. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci* 115: 323-327.
- Kayser JP, Amann RP, Shidefer RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 30: 601-614.
- Kulaksiz R, Cebi C, Akcay E, Daskin A. 2010. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Rum Res* 88: 12-15.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod* 67: 1250-1258.
- MataHine T, Burhanuddin, Marawali A. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. *J Veteriner* 15: 263-273.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Mukai C, Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71: 540-547.
- Parera F, Zulhaidah P, Souhoka DF, Rizal M. 2009. Pemanfaatan sari wortel sebagai pengencer alternatif spermatozoa epididimis sapi bali. *J Pengembangan Peternakan Tropis* 34: 50-56.
- Parks JE, Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- Qomariyah, Mihardja S, Idi R. 2001. Pengaruh kombinasi kuning telur dengan air kelapa terhadap daya tahan hidup dan abnormalitas spermatozoa domba priangan pada penyimpanan 5°C. Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Balitbang Pertanian, Departemen Pertanian. Bogor, 17-18 September 2001. Hlm. 172-177.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22: 278-283.

- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36: 77-86.
- Rizal M. 2004. Penyimpanan epididimis domba pada suhu 5°C selama tiga hari: pengaruhnya terhadap kualitas spermatozoa yang telah dibekukan. *Media Kedokteran Hewan* 20: 57-61.
- Rizal M, Achjadi RK, Herdis, Surachman M, Yulnawati. 2006. Kriopreservasi semen domba garut menggunakan pengencer air kelapa muda. Di dalam: Prosiding Seminar Nasional Peranan Bioteknologi Reproduksi dalam Pembangunan Peternakan dan Perikanan di Indonesia. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 8 April 2006. Hlm. 69-72.
- Rizal M, Riyadhhi M. 2016. Fertilitas semen kerbau rawa (*Bubalus bubalis carabanensis*) yang diencerkan dengan pengencer nira aren. *J Veteriner* 17: 457-467.
- Senger PL. 1999. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. Pullman: Current Conception Inc.
- Solihati N, Ruhijat I, Rasad SD, Rizal M, Fitriati M. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, Tris, dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *Anim Prod* 10: 22-29.
- SNI (Standar Nasional Indonesia). 2008. *Semen Beku Sapi*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional (BSN).
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika, Suatu Pendekatan Biometrik*. Alih Bahasa: B. Sumantri. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Shum WWC, Ruan YC, da Silva N, Breton S. 2011. Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *J Androl* 32: 576-586.
- Swellum AA, Mansour HA, Elsayed AA, Amer HA. 2011. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of buffalo bull semen in egg-yolk containing extenders. *Theriogenology* 76: 833-842.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- White IG. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.
- Woelders H, Matthij A, Engel B. 1997. Effect of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiol* 35: 93-105.
- Yong JW, Ge L, Ng YF, Tan SN. 2009. The chemical composition and biological properties of coconut (*Cocos nucifera* L.) water. *Molecules* 14: 5144-5164.
- Yulnawati, Setiadi MA, Herdis. 2005. Pemanfaatan sari buah melon dan sari wortel sebagai media pengencer alternatif semen cair domba Garut. *Protein* 12: 151-160.
- Yulnawati, Herdis, Maheshwari H, Rizal M. 2008. Kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang pada penambahan raffinosa sebagai krioprotektan ekstraseluler. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 13: 30-34.