

## **Efektivitas Suplementasi Filtrat Jambu Biji dalam Pengencer Air Kelapa-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Bali**

*(THE EFFECTIVENESS OF GUAVA FILTRATE SUPPLEMENTATION  
IN COCONUT WATER-EGG YOLK DILUTION ON QUALITY  
OF LIQUID SEMEN OF BALI CATTLE)*

**Aloysius Marawali, Muhammad S. Abdullah, Jalaludin**

Program Studi Peternakan,  
Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana  
Jl. Adisucipto, Penfui, Kotak Pos 104,  
Kupang, Nusa Tenggara Timur, Indonesia 85001,  
Telpon (0380)-881084; Email: [alloysiusmarawali21@gmail.com](mailto:alloysiusmarawali21@gmail.com)

### **Abstrak**

Tujuan penelitian ini adalah menguji efektivitas suplementasi filtrat jambu biji (FJB) ke dalam pengencer air kelapa kuning telur terhadap kualitas semen cair sapi Bali pada penyimpanan suhu 5°C. Semen ditampung dari seekor sapi Bali jantan berumur 5 tahun menggunakan vagina buatan. Semen dengan kualitas baik dibagi dalam enam tabung sesuai perlakuan selanjutnya semen disimpan pada suhu 5°C. Adapun perlakuan penelitian ini adalah P0 =air 80%+kuning telur 20% tanpa penambahan FJB; P1=air kelapa 80%+kuning telur 20%+0,8% FJB, P2 = air kelapa 80%+kuning telur 20%+0,9% FJB, P3 = air kelapa 80%+kuning telur 20%+1,0% FJB, P4= air kelapa 80%+kuning telur 20%+1,1% FJB, dan P5= air kelapa 80%+kuning telur 20%+1,2%. Setiap perlakuan diulang 8 kali sehingga terbentuk 48 unit percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas, viabilitas, MPU dan TAU spermatozoa setelah tiga hari penyimpanan untuk P0 : adalah 43,20%, 41,85%, 39,08% dan 40,90%; P1 : 50,40%, 53,89%, 52,99% dan 54,67%; P2 : 54,67%, 56,97%, 54,51% dan 54,36%; P3 : 17,00%, 29,96%, 29,64% dan 29,64%; P4 : 23,38%, 24,64%, 21,06% dan 24,45% dan P5 : 9%, 21,25%, 17,56% dan 19,30%. Hasil analisis statistika menunjukkan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara perlakuan terhadap motilitas, viabilitas, MPU dan TAU spermatozoa sapi Bali sampai hari ketiga penyimpanan. Dapat disimpulkan bahwa penambahan filtrat jambu biji (FJB) 0.9% dalam pengencer air kelapa 80% kuning telur 20% dapat mempertahankan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU) dan tondung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi Bali sampai hari ketiga penyimpanan pada suhu 5°C.

Kata-kata kunci: motilitas, viabilitas; spermatozoa; MPU; TAU; filtrat jambu biji (FJB)

### **Abstract**

The aim of this research was to know the effectiveness of guava filtrate supplementation in coconut water- egg yolk dilution on quality of liquid semen stored at 5°C of Bali cattle. Semen collected from a five year old Bali cattle using artificial vagina. Semen of good quality were kept in six tubes based on treatment then stored at 5°C. Treatments of the research were P0 : coconut water 80% + egg yolk 20% without guava filtrate; P1 : coconut water 80% + egg yolk 20% + 0.8% guava filtrate; P2 : coconut water 80% + egg yolk 20% + 0.9% guava filtrate; P3 : coconut water 80% + egg yolk 20% + 1.0 % guava filtrate; P4 : coconut water 80% + egg yolk 20% + 1.1 % guava filtrate and P5 : coconut water 80% + egg yolk 20% + 1.2 % guava filtrate. Each treatment was replicated 8 times making 48 experimental units. Results of the study showed that percentage mean of motility, viability, MPU, and TAU of spermatozoa after three days storage for P0 were : 42.20%, 41.85%, 39.08% and 40.90%; P1 : 50.40%, 53.89%, 52.99% and 54.67%; P2 : 54.67%, 56.97%, 54.51% and 54.36%; P3 : 17.00%, 29.96%, 29.64% and 29.64%; P4 : 23.38%, 24.64%, 21.06% and 24.45%

and P5 : 9%, 21.25%, 17.56% and 19.30%. Result of statistical analysis showed that there were a significant effect ( $P < 0.05$ ) between treatment on motility, viability, MPU and TAU of spermatozoa of Bali cattle till the third day of storage. It can be concluded that the supplementation of guava filtrate 0.9% in dilution of coconut water 80% - egg yolk 20% had been able to maintain motility, viability, MPU and TAU of spermatozoa of Bali cattle till the third day of storage at 5°C.

Key words: motility; viability; spermatozoa; MPU; TAU; guava filtrate

## PENDAHULUAN

Salah satu solusi yang dapat digunakan untuk pengembangan program Inseminasi buatan (IB) secara cepat dan mudah pada sapi bali adalah penggunaan semen cair. Penggunaan semen cair dapat meningkatkan kinerja IB pada sapi bali di Nusa Tenggara Timur (NTT). Keunggulan lain semen cair dapat diproduksi menggunakan bahan pengencer herbal berbasis bahan lokal dan peralatan yang sederhana serta mudah diperoleh dan tidak tergantung dengan persediaan nitrogen cair.

Hasil akhir dari metabolisme spermatozoa adalah terbentuknya radikal bebas berupa derivat oksigen di antaranya adalah single oksigen ( $^1O_2$ ), tripel oksigen ( $^3O_2$ ), superoksida anion ( $O_2^-$ ), hidroksil radikal (OH) dan nitrit oxide (NO-) yang semuanya disebut radikal oksigen species (ROS). Single oksigen dapat merusak ikatan rangkap pada asam lemak sehingga dapat menyebabkan kerusakan *Deoxyribo Nucleic Acid* (DNA) dan protein. Single oksigen bila bereaksi dengan asam amino histidin akan membentuk enzim yang dapat menyebabkan denaturasi protein.

Kerusakan spermatozoa pada penyimpanan suhu 5°C akibat radikal bebas dan *cold shock* inilah merupakan penyebab utama disfungsi semen (Sharma *et al.*, 2000). Oksidasi fosforilasi yang terganggu menyebabkan peningkatan radikal bebas dalam semen. Kadar radikal bebas yang terganggu menyebabkan peningkatan radikal bebas dalam semen. Kadar radikal bebas yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA. Lipid membran plasma semen memiliki fosfolipid dengan kadar yang tinggi menyebabkan semen rentan terhadap radikal bebas (Sanoeka dan Kurpisz, 2004).

Antioksidan bertindak mengikat asam lemak tak jenuh dan mencegah terjadinya

reaksi berantai. Pada proses penyimpanan semen akan terjadi kerusakan membran plasma spermatozoa akibat terbentuknya *peroksidasi lipid*. Antioksidan-pemutus rantai seperti yang terkandung dalam jambu biji dapat menghambat *peroksidasi lipid* dalam membran melalui *radical peroxy* (RO) dan *alkoxy* (ROO) pengurai.

Penggunaan jambu biji yang difilter dalam pengencer air kelapa kuning telur dapat menjaga kualitas spermatozoa (motilitas, keutuhan akrosom, viabilitas dan morfologi spermatozoa) semen cair sapi bali selama penyimpanan pada suhu 5°C. Dosis jambu biji yang difilter yang terbaik dalam pengencer air kelapa kuning telur, akan terbaik pula dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sampai tujuan IB.

Adapun tujuan penelitian ini adalah menguji berbagai level pemberian filtrat jambu biji (FJB) dalam pengencer air kelapa kuning telur terhadap motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi bali yang disimpan pada suhu 5°C.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Reproduksi milik Yayasan Williams dan Laura yang berlokasi di Tilong, Desa Oelnasi, Kec. Kupang Tengah, Kab. Kupang, Nusa Tenggara Timur, dan berlangsung selama delapan bulan. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen sapi bali yang ditampung dari satu ekor sapi bali jantan berumur lima tahun milik Yayasan Williams dan Laura yang telah dilatih, memiliki performans yang baik, dan organ reproduksi normal. Pakan yang diberikan adalah hijauan berupa rumput dan legum dan pemberian konsentrat secukupnya (dedak padi dan jagung giling).

### **Pembuatan Filtrat Jambu Biji**

Penyiapan jambu biji yang disaring (FJB) dilakukan sesuai metode yang dilaksanakan oleh Menchaca *et al.* (2005) dengan sedikit modifikasi. Jambu biji dipersiapkan dengan melarutkan isi jambu biji yang telah *diblender* ke dalam aquabidest dengan perbandingan 1:2, lalu disentri-fugasi dua kali dengan 3500 rpm selama 10 menit. Selanjutnya supernatannya difilter menggunakan membran Millipore (Sartorius stedim Minisart ®) 0.42 µm dan dilanjutkan dengan 0.20 µm. Larutan yang sudah disaring dimasukkan ke dalam penangas air/*water bath* pada suhu 60°C selama tiga menit. Level FJB yang digunakan diformulasi berdasarkan kebutuhan vitamin C, 0.5 mM/mL (v/v) [20:1].

### **Penampungan dan Evaluasi Semen**

Semen ditampung dua kali per minggu dengan menggunakan vagina buatan. Segera setelah ditampung, ejakulat semen ditempatkan dalam *water bath* (37°C) hingga dilakukan evaluasi kualitas semen secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi secara makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi dan pH semen, sedangkan evaluasi secara mikroskopis meliputi pergerakan massa, pergerakan individu, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), konsentrasi dan abnormalitas spermatozoa. Semen yang berkualitas baik memiliki kriteria motilitas spermatozoa di atas 70%, abnormalitas spermatozoa di bawah 20%.

### **Pengenceran dan Pengemasan Semen**

Semen sapi bali diencerkan dengan pengencer dasar air kelapa-kuning telur (AkKt) yang disuplementasi dengan filtrat jambu biji (FJB) pada 5 konsentrasi yang berbeda: 0% FJB, 0,8% FJB, 0,9% FJB, 1% FJB, 1,1% FJB dan 1,2% FJB. Masing-masing perlakuan diulang delapan kali sehingga terbentuk 48 unit percobaan. Semen yang telah diencerkan selanjutnya disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 5°C untuk produksi semen cair, dan evaluasi semen dilakukan setiap hari untuk menentukan daya tahan hidup sperma *in vitro*. Evaluasi kualitas spermatozoa didasarkan pada viabilitas, motilitas, membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU).

Hasil pengamatan integritas membran plasma utuh (MPU) dengan menggunakan metode *hypoosmotik swelling test* dan pewarnaan eosin negrosin yang diamati dengan mikroskop cahaya. Spermatozoa yang memiliki integritas membran plasma utuh dan hidup ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti ekor berputar dengan pancaran warna terang (a). Spermatozoa dengan membran plasma rusak dan hidup ditandai oleh ekor yang lurus serta tidak ada pembengkakan kepala dengan pancaran warna terang (b). Spermatozoa dengan membran plasma rusak dan mati ditandai dengan ekor yang lurus dan tidak ada pembengkakan kepala disertai pancaran warna merah.

### **Variabel Penelitian**

Variabel yang diukur dalam penelitian ini adalah: 1) Motilitas progresif spermatozoa (%): adalah suatu indikator kualitas semen dan dianalisis di bawah mikroskop (100 kali), yang dilengkapi dengan meja pemanas yang suhunya dipertahankan pada 37°C. Motilitas spermatozoa diestimasi dengan menganalisis tiga lapang pandang mikroskopik, berbeda untuk setiap sampel. Skor akhir menjadi nilai rata-rata dari ketiga lapang pandang; 2) Viabilitas semen cair (%): sebagai indikator integritas struktur membran, dievaluasi dengan pewarnaan eosin. Spermatozoa yang mati, menyerap zat warna (berwarna merah) sedangkan spermatozoa hidup tidak menyerap zat warna. Sekitar 200 spermatozoa dihitung di bawah mikroskop cahaya (1000 kali); 3) Membran plasma utuh (MPU; %): persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh; pengukuran dilakukan dengan teknik *Hypoosmotic swelling test* (*Hos test*); 4) Tudung akrosom utuh (TAU; %): persentase spermatozoa yang memiliki tudung akrosom yang utuh.

### **Analisis Data**

Data yang diperoleh dihitung rata-ratanya dan dianalisis dengan sidik ragam atau *analysis of variance*, kemudian dilanjutkan dengan Uji Duncan. Analisis menggunakan *software* SPSS 17.0 for windows dan *MS office Excell* 2007.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Sapi Bali

Semen yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari sapi bali bibit yang dipelihara secara intensif dan sudah terbiasa ditampung semennya menggunakan vagina buatan (VB). Evaluasi karakteristik semen segar dilakukan baik secara makroskopis meliputi volume, warna, pH, konsistensi, dan secara mikroskopis adalah motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, konsentrasi dan abnormalitas spermatozoa.

Berdasarkan hasil evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi bali yang diperoleh (Tabel 1) memberi gambaran bahwa kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini sangat baik

dilihat dari aspek volume, motilitas, konsentrasi, viabilitas, pH, MPU dan TAU. Kualitas semen segar yang baik sangat menentukan kualitas dan fertilitas spermatozoa setelah penyimpanan. Keberhasilan pelaksanaan inseminasi buatan (IB) sangat tergantung pada tersedianya semen dengan kualitas tinggi, baik semen segar maupun semen setelah diproses seperti semen cair dan semen beku (Holt *et al.*, 2005). Adapun karakteristik semen segar yang digunakan dalam penelitian adalah gerakan massa 3<sup>+++</sup>, persentase spermatozoa motil 85%, konsentrasi spermatozoa 1524x10<sup>6</sup> per mL semen, spermatozoa abnormal 5,16±2,24%, persentase MPU 90,16±1,42% dan 90,12±0,26%. Beberapa peneliti menyatakan bahwa semen segar yang baik harus memiliki spermatozoa

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi bali penelitian

Parameter Pengamatan	Hasil Pengamatan
Makroskopis	
Volume (mL)	4,04±0,12
Warna	Krem
Konsistensi	Kental
pH	6,40±0,0
Bau	Khas
Mikroskopis	
Motilitas Massa	+++
Motilitas Individu (%)	85,00±2,09
Viabilitas ((%)	0,12±2,03
Abnormalitas (%)	5,16±2,24
Konsentrasi (10 <sup>6</sup> /ml)	1524,40±146,22
Membran Plasma Utuh (MPU:%)	90,16±1,42
Tudung Akrosom Utuh (TAU:%)	90,12±0,26

Tabel 2. Persentase spermatozoa motilitas semen cair sapi bali dengan penambahan FJB dalam pengencer air kelapa+kuning telur 20% pada penyimpanan suhu 5°C.

Perlakuan	Lama Penyimpanan (hari)				% Penurunan
	0	1	2	3	
AkKt+0% FJB	85	53,00±2,73 <sup>b</sup>	50,00±1,58 <sup>b</sup>	43,20±2,95 <sup>b</sup>	14,00
AkKt+0.8% FJB	85	63,40±3,13 <sup>a</sup>	57,40±4,08 <sup>a</sup>	50,40±2,30 <sup>ab</sup>	11,67
AkKt+0.9% FJB	85	66,00±1,58 <sup>a</sup>	60,60±1,14 <sup>a</sup>	53,40±2,70 <sup>a</sup>	10,67
AkKt+1.0% FJB	85	33,00±7,58 <sup>c</sup>	20,00±6,12 <sup>c</sup>	17,00±11,18 <sup>c</sup>	22,67
AkKt+1.1% FJB	85	31,00±6,51 <sup>c</sup>	16,00±4,18 <sup>cd</sup>	12,00±9,75 <sup>c</sup>	24,33
AkKt+1.2% FJB	85	27,00±4,47 <sup>c</sup>	12,00±2,73 <sup>d</sup>	9,00±6,71 <sup>c</sup>	26,33

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05)

motil 70% (Evans dan Maxwell, 1987), abnormalitas spermatozoa 6-10% (Delgadillo *et al.*, 1992) dan MPU 60% (Revell dan Mrode, 1994).

Motilitas individu adalah gerakan individu spermatozoa yang maju ke depan (progresif). Pengamatan dilakukan sampai hari ketiga atau setelah motilitas progresif mencapai minimal 40%. Motilitas sangat menentukan kemampuan spermatozoa untuk sampai ke tempat pembuahan yaitu di ampulla *Tuba Fallopii*, terutama kemampuan untuk dapat mendekati oosit sehingga proses fertilisasi dapat berlangsung. Motilitas spermatozoa sampai hari ketiga penyimpanan disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 disajikan bahwa persentase motilitas spermatozoa pada P1 dan P2 dalam pengencer AkKt lebih tinggi dibandingkan dengan motilitas spermatozoa pada P0, P3, P4 dan P5. Rataan persentase motilitas spermatozoa pada kelompok P0, P1, P2, P3, P4 dan P5 disajikan pada Tabel 2.

Hasil analisis statistika pada hari pertama dan hari kedua penyimpanan persentase motilitas spermatozoa pada P0, P3, P4 dan P5 secara nyata ( $P < 0,05$ ) lebih rendah dibandingkan dengan P1 dan P2. Hari ketiga penyimpanan persentase motilitas spermatozoa pada P0, P1 dan P2 secara nyata ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan P3, P4 dan P5 sedangkan pada P1 dan P2 dari hari pertama sampai hari ketiga penyimpanan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ). Motilitas tertinggi spermatozoa adalah pada P2 dan berbeda secara nyata ( $P < 0,05$ ) dengan P0, P3, P4 dan P5. Tabel 2 juga memberikan gambaran bahwa rata-rata persentase penurunan motilitas spermatozoa yang tertinggi pada P5 (26,33%) dan yang terendah adalah 10,67% (P2).

Dari aspek motilitas spermatozoa menunjukkan bahwa perlakuan P0, P1, P2, masih layak digunakan untuk kegiatan inseminasi yaitu masing-masing dengan persentase motilitas 43,20%, 50,40% dan 53,40% sampai hari ketiga penyimpanan, sedangkan motilitas spermatozoa pada perlakuan P3, P4 dan P5 hanya sampai hari pertama penyimpanan masing-masing adalah 33,00%; 31,00% dan 27,00% sehingga tidak layak digunakan untuk IB karena motilitas spermatozoa sudah berada di bawah standart IB yaitu motilitas minimal 40%. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini lebih rendah dengan hasil yang dilaporkan (Labetubun dan

Siwa, 2011) dengan motilitas spermatozoa sapi bali  $60,00 \pm 3,16\%$  dan  $59,00 \pm 2,24\%$  setelah penyimpanan hari ketiga dengan perlakuan pengencer dasar 80% tris+20% kuning telur+0,6 g laktosa per 100 mL pengencer dan 80% tris+20% kuning telur+0,6 g maltosa per 100 mL pengencer. Demikian juga hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan Marawali dan Sinlae, (2016) dengan motilitas spermatozoa sapi bali 63%, 70% dan 73% setelah penyimpanan hari ketiga dengan pengencer dasar masing-masing air kelapa 80% + kuning telur 20% + 0,4 g  $\alpha$  tokoferol; pengencer air kelapa 80% + kuning telur 20% + 0,6 g  $\alpha$  tokoferol dan pengencer air kelapa 80% + kuning telur 20% + 0,8 g  $\alpha$  tokoferol. Sumadisa *et al.* (2015) melaporkan persentase motilitas spermatozoa sapi bali sampai hari ketiga penyimpanan dingin ( $5^{\circ}\text{C}$ ) CEP-2+16% KT+4% FJB; CEP-2+14% KT+6% FJB; CEP-2+12% KT+8% FJB; CEP-2+10% KT+10% FJB; masing-masing  $64,15 \pm 3,57\%$ ;  $65,75 \pm 2,42\%$ ;  $66,70 \pm 1,49\%$  dan  $67,85 \pm 1,80\%$ , lebih tinggi dari hasil yang diperoleh dalam penelitian ini.

Adanya perbedaan hasil yang diperoleh dari berbagai hasil penelitian mungkin disebabkan oleh beberapa faktor yakni suhu, waktu penelitian, jenis bahan pe-ngencer yang digunakan, dan lingkungan.

Pada Tabel 3 disajikan bahwa viabilitas spermatozoa sapi bali pada kelima kelompok perlakuan P1 dan P2 lebih tinggi dibandingkan dengan viabilitas spermatozoa kelompok kontrol, P3, P4 dan P5. Persentase viabilitas tertinggi terdapat pada perlakuan P2, diikuti P1 dan P0. Berdasarkan hasil analisis statistika pada hari pertama sampai hari ketiga penyimpanan persentase viabilitas spermatozoa pada P0 dan dengan penambahan P3, P4 dan P5 menunjukkan pengaruh yang nyata ( $P < 0,05$ ) lebih rendah dibandingkan dengan penambahan P1 dan P2. Pada hari pertama penyimpanan persentase viabilitas spermatozoa pada P3, P4 dan P5 menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ). Perlakuan P1 dan P2 secara nyata ( $P < 0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa P0, P3, P4 dan P5. Persentase viabilitas tertinggi spermatozoa adalah P2 dan berbeda secara nyata ( $P < 0,05$ ) dengan P0, P3, P4 dan P5. Selanjutnya berdasarkan Tabel 3 juga terlihat bahwa rata-rata persentase penurunan viabilitas spermatozoa yang tertinggi adalah P5 (26,33%) dan terendah adalah P2 (10,67%).

Tabel 3. Persentase viabilitas spermatozoa dalam semen cair sapi bali dengan penambahan FJB dalam pengencer air kelapa+kuning telur 20% pada penyimpanan suhu 5°C.

Perlakuan	Lama Penyimpanan (hari)				% Penurunan
	0	1	2	3	
AkKt+0% FJB	90	60,14±4,95 <sup>b</sup>	49,29±6,99 <sup>b</sup>	41,85±4,32 <sup>b</sup>	14,00
AkKt+0.8% FJB	90	69,40±1,14 <sup>a</sup>	59,70±6,06 <sup>a</sup>	53,89±4,58 <sup>a</sup>	11,67
AkKt+0.9% FJB	90	69,03±3,49 <sup>a</sup>	60,88±4,76 <sup>a</sup>	56,97±1,69 <sup>a</sup>	10,67
AkKt+1.0% FJB	90	43,19±6,98 <sup>c</sup>	38,84±1,95 <sup>c</sup>	29,96±2,35 <sup>c</sup>	22,67
AkKt+1.1% FJB	90	39,09±7,11 <sup>c</sup>	33,76±3,02 <sup>c</sup>	23,38±2,44 <sup>d</sup>	24,33
AkKt+1.2% FJB	90	35,32±5,19 <sup>c</sup>	24,45±2,79 <sup>d</sup>	21,25±1,04 <sup>d</sup>	26,33

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ )

Semakin tinggi penambahan FJB ke dalam pengencer AkKt semakin tinggi pula penurunan viabilitas spermatozoa, hal ini mungkin disebabkan oleh semakin pekat atau kentalnya pengencer sehingga berakibat pada sulitnya spermatozoa bergerak. Jika larutan pengencer semakin pekat, maka pergerakan spermatozoa akan menjadi sangat lambat dan untuk dapat bergerak membutuhkan energi yang semakin banyak. Ada kemungkinan kadar antioksidan yang terlampaui tinggi justru menyebabkan efek negatif terhadap viabilitas spermatozoa.

Viabilitas spermatozoa sapi bali sampai hari ketiga penyimpanan untuk P0 adalah 41,85±4,32%, P1 adalah 53,89±4,58%, P2 adalah 56,97±1,69%, P3 adalah 29,96±2,35%, P4 adalah 23,38±2,44%, dan P5 adalah 21,25±1,04% dengan rata-rata penurunan dari yang terendah sampai yang tertinggi adalah P2 (10,67%), P1 (11,67%), P0 (14,00%), P3 (22,67%), P4 (24,33%) dan P5 (26,33%). Viabilitas spermatozoa sapi bali yang diperoleh dalam penelitian ini sampai hari ketiga penyimpanan lebih rendah dibandingkan hasil yang dilaporkan (Labetubun dan Siwa, 2011) dengan viabilitas spermatozoa sapi bali 71,20±1,17% dan 69,80±2,05% setelah penyimpanan hari ketiga dengan perlakuan pengencer dasar 80% tris + 20% kuning telur + 0,6 g laktosa per 100 mL pengencer dan 80% tris + 20% kuning telur + 0,6 g maltosa per 100 mL pengencer. Demikian juga hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase viabilitas spermatozoa lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan (Marawali dan Sinlae, 2016) dengan persentase viabilitas spermatozoa sapi bali 63%, 70% dan 73% setelah penyimpanan hari ketiga dengan pengencer dasar masing-masing air kelapa 80%

+ kuning telur 20% + 0,4 g  $\alpha$  tokoferol, pengencer air kelapa 80% + kuning telur 20% + 0,6 g  $\alpha$  tokoferol dan pengencer air kelapa 80% + kuning telur 20% + 0,8 g  $\alpha$  tokoferol. Sumadiasa *et al.* (2015) melaporkan persentase viabilitas spermatozoa sapi bali sampai hari ketiga penyimpanan dingin (5°C) CEP-2+16% KT+4% FJB, CEP-2+14% KT+6% FJB, CEP-2+12% KT+8% FJB, CEP-2+10% KT+10% FJB, masing-masing 79,70±2,60%; 81,50±1,70%, 83,30±1,40% dan 86,00±1,80%, jauh lebih tinggi dari hasil yang diperoleh dalam penelitian ini.

Membran plasma utuh (MPU) merupakan hal yang mutlak harus dimiliki spermatozoa yang fertil karena membran plasma memegang peranan utama dalam mengatur seluruh proses biokimia yang terjadi di dalam sel. Keutuhan membran plasma sangat menentukan hidup dan matinya spermatozoa, oleh karena itu persentase MPU seharusnya tidak jauh berbeda dari nilai spermatozoa hidup (Rizal, 2002).

Pada Tabel 4 disajikan bahwa membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi bali pada tahap pengamatan mulai hari pertama sampai hari ketiga masih tergolong bagus terdapat pada perlakuan P1 dan P2, sedangkan P0 sampai hari kedua, P3 sampai hari pertama penyimpanan, P4 dan P5 MPU sudah sangat rendah sampai penyimpanan hari pertama. Rataan MPU untuk masing-masing perlakuan mulai hari pertama sampai hari ketiga penyimpanan untuk P0, P1, P2, P3, P4 dan P5 disajikan pada Tabel 4.

Hasil analisis statistika menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) antara perlakuan P1 dan P2 dengan P0, P3, P4 dan P5), antara P0 dengan P3, P4 dan P5 sampai hari ketiga penyimpanan, sedangkan antara P3,

P4 dan P5 berbeda tidak nyata ( $P>0,05$ ). Hal ini memberikan gambaran bahwa penambahan filtrat jambu biji 0,8% dan 0,9% ke dalam pengencer AkKt pada semen sapi bali mampu menghambat kerusakan integritas membran plasma spermatozoa. Hal ini sejalan dengan pendapat (Sumadiasa *et al.*, 2015) yang menyatakan bahwa substitusi kuning telur dengan 10% FJB merupakan salah satu sumber antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga mencegah kerusakan membran spermatozoa sapi bali.

Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi bali yang diperoleh dalam penelitian ini sampai hari ketiga penyimpanan lebih rendah dibandingkan dengan hasil yang dilaporkan (Labetubun dan Siwa, 2011) dengan MPU spermatozoa sapi bali  $73,00\pm 1,41\%$  dan  $73,00\pm 0,71\%$  setelah penyimpanan hari ketiga

dengan perlakuan pengencer dasar 80% tris + 20% kuning telur + 0,6 g laktosa per 100 mL pengencer dan 80% tris + 20% kuning telur + 0.6 g maltosa per 100 mL pengencer.

Adanya perbedaan hasil yang diperoleh dari berbagai hasil penelitian mungkin disebabkan oleh beberapa faktor yakni suhu, waktu penelitian, jenis bahan pengencer yang digunakan, dan lingkungan.

Berdasarkan hasil penelitian tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi bali pada tahap preservasi suhu  $5^{\circ}\text{C}$  dari hari pertama sampai hari ketiga pengamatan menunjukkan bahwa persentase TAU spermatozoa untuk P0, P1 dan P2 masing-masing adalah  $40,90\pm 3,1\%$ ;  $54,67\pm 2,63\%$  dan  $54,36\pm 5,86\%$ , masih berada pada persentase yang layak untuk keperluan Inseminasi Buatan (IB), sedangkan untuk P3 hanya sampai hari kedua penyimpanan

Tabel 4. Persentase MPU spermatozoa semen cair sapi bali dengan penambahan FJB dalam pengencer air kelapa+kuning telur 20% pada penyimpanan suhu  $5^{\circ}\text{C}$ .

Perlakuan	Penyimpanan (Hari)			
	0	1	2	3
AkKt+0% FJB	90	$59,63\pm 5,35^b$	$56,47\pm 4,29^b$	$39,08\pm 4,90^b$
AkKt+0,8% FJB	90	$69,31\pm 1,38^a$	$62,42\pm 2,55^a$	$52,99\pm 4,88^a$
AkKt+0,9% FJB	90	$65,97\pm 5,01^a$	$61,42\pm 3,36^a$	$54,51\pm 5,65^a$
AkKt+1,0% FJB	90	$42,93\pm 7,49^c$	$36,29\pm 4,58^c$	$29,64\pm 3,06^c$
AkKt+1,1% FJB	90	$39,59\pm 8,03^c$	$29,72\pm 5,40^d$	$21,06\pm 4,33^d$
AkKt+1,2% FJB	90	$37,89\pm 2,97^c$	$23,41\pm 4,71^e$	$17,56\pm 3,85^d$

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P>0,05$ )

Tabel 5. Persentase TAU spermatozoa sapi bali setelah pemberian FJB dalam pengencer air kelapa+kuning telur 20% pada penyimpanan  $5^{\circ}\text{C}$

Perlakuan	Penyimpanan (Hari)			
	0	1	2	3
AkKt+0% FJB	90	$59,81\pm 5,14^b$	$52,68\pm 2,73^b$	$40,90\pm 3,81^b$
AkKt+0,8% FJB	90	$69,39\pm 1,93^a$	$62,40\pm 5,01^a$	$54,67\pm 2,63^a$
AkKt+0,9% FJB	90	$66,51\pm 5,32^a$	$61,79\pm 4,20^a$	$54,36\pm 5,86^a$
AkKt+1,0% FJB	90	$44,24\pm 7,25^c$	$40,08\pm 1,42^c$	$30,89\pm 3,52^c$
AkKt+1,1% FJB	90	$43,80\pm 3,38^c$	$34,33\pm 2,43^d$	$24,45\pm 2,27^d$
AkKt+1,2% FJB	90	$40,09\pm 1,56^c$	$26,21\pm 2,75^e$	$19,30\pm 1,38^e$

Keterangan: Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P>0,05$ )

serta P4 dan P5 hanya sampai hari pertama. Keberhasilan IB tidak hanya ditentukan oleh motilitas progresif spermatozoa tetapi juga dipengaruhi oleh TAU sel spermatozoa. Tudung akrosom yang utuh berpengaruh baik terhadap proses kapasitasi dan reaksi akrosom pada saat pembuahan sehingga memberikan pengaruh positif terhadap fertilitas spermatozoa sapi bali pada saat pembuahan terjadi.

Mekanisme patologis kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas atau oksidan dapat melalui tiga cara yaitu: 1) peroksidasi lipid: radikal bebas dapat menyerang asam lemak tidak jenuh (*polyunsaturated fatty acid*) pada membran sel menyebabkan peoksidasi lipid. Pemecahan asam lemak menghasilkan pembentukan berbagai produk oksidatif, yang toksik terhadap sel. Membrane sel mengandung sejumlah besar *polyunsaturated fatty acid*, yang berfungsi untuk mempertahankan fluiditasnya. Peroksidasi asam lemak-asam lemak ini menyebabkan kehilangan fluiditas membrane dan penurunan aktivitas enzim-enzim membran dan ion *channel*. Sebagai akibatnya, meknisme seluler normal yang diperlukan untuk berbagai proses fisiologis terhambat (Agarwal dan Allamaneni, 2004); 2) kerusakan DNA: level radikal bebas yang tinggi menyebabkan fragmentasi DNA. Berbagai tipe abnormalitas DNA seperti modifikasi basa, produksi *base-free site*, DNA *cross-links* dan *chromosomal rearrangements*; 3) Apoptosis: ROS juga dapat menginisiasi suatu rangkaian reaksi yang akhirnya menyebabkan apoptosis. Apoptosis adalah proses alamiah tubuh yang menyingkirkan sel tua dan sel senescent; suatu proses kematian sel yang terprogram. Apoptosis dapat diinduksi dalam kultur sel oleh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, yang mendukung teori bahwa ROS dilibatkan dalam apoptosis. Proses apoptosis juga dapat dipercepat oleh kerusakan DNA yang diinduksi radikal bebas (Sikka, 2004).

Oksidan dapat bereaksi dengan biomolekul seperti lipid, protein, dan DNA. Untuk lipid, membrane lipid dan lipid dalam sirkulasi lipoprotein seperti *low-density lipoprotein* (LDL) dapat berinteraksi dengan radikal bebas menghasilkan lipid peroksidasi. Ketika lipid peroksidasi terbentuk, mereka dapat berinteraksi dengan oksigen untuk membentuk *highly reactive peroxy radicals* dan selanjutnya mengalami propagasi radikal untuk membentuk hidroperoksidasi. Askorbat dapat mengurangi inisiasi radikal bebas sehingga lipid

peroksidasi dapat dihambat (Padayatty *et al.*, 2003).

Baker (2016) menyatakan bahwa modifikasi protein dan metabolisme energi berhubungan secara langsung maupun tidak langsung dengan motilitas dan fertilitas spermatozoa. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa tertinggi dicapai pada P2. Peranan utama adalah sebagai sumber energi, namun protein juga berperan sebagai komponen penyusun sel terutama membran plasma (Shen *et al.*, 2013) dan dengan demikian, keberadaan protein yang tinggi dalam filtrat jambu biji dapat memelihara integritas membran sel spermatozoa selama proses preservasi pada suhu rendah (5°C).

Kandungan berbagai senyawa antioksidan yang terdapat di dalam jambu biji juga sangat berperan dalam mempertahankan hidup spermatozoa. Senyawa antioksidan seperti vitamin C, vitamin A, saponin, fenolik, dan flavonoid sangat bermanfaat untuk menangkal atau melindungi sel spermatozoa terhadap serangan radikal bebas yang produksinya selama penyimpanan *in vitro* cukup tinggi. Proteksi oleh antioksidan tersebut sangat nyata berkontribusi terhadap peningkatan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Hal ini terbukti dengan adanya penambahan 0,9% FJB dalam pengencer AkKt mampu meningkatkan integritas membran plasma dan tudung akrosom yang disertai dengan peningkatan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Selama penyimpanan *in vitro*, spermatozoa memproduksi radikal bebas yang cukup tinggi yang selanjutnya menyerang membran plasma dan *deoxyribo nucleic acid* (DNA; Peris *et al.*, 2007; Dowling *et al.*, 2009),. kerusakan membran plasma menyebabkan transportasi oksigen, berbagai zat nutrisi dan ion yang masuk ataupun keluar sel terganggu dan menyebabkan kelangsungan hidup spermatozoa menjadi rendah. Kerusakan DNA berdampak pada kegagalan proses transkripsi dan translasi untuk sintesis protein dan bermuara pada kejadian apoptosis sel. Namun dengan adanya antioksidan yang terdapat di dalam EDK, maka serangan radikal bebas dapat ditangkal dan sel terhindar dari kerusakan dan kematian.

Namun di sisi lain, pada konsentrasi yang lebih tinggi (1,0%, 1,1% dan 1,2%), filtrat jambu biji memberikan pengaruh penurunan motilitas, viabilitas, MPU dan TAU spermatozoa. Hal ini disebabkan oleh adanya peningkatan

tekanan osmotik (hipertonis) yang berlebihan pada ketiga konsentrasi FJB tersebut. Peningkatan konsentrasi FJB di dalam pengencer AkKt menyebabkan konsentrasi zat terlarut di luar sel jauh lebih tinggi daripada di dalam sel. Kondisi yang demikian menyebabkan air dari dalam sel akan keluar sel dan menyebabkan sel sperma mengkerut dan mati.

### SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa: Penambahan 0,9% filtrat jambu biji dalam pengencer air kelapa kuning telur dapat mempertahankan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU dan tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi bali pada penyimpanan suhu 5°C. Penyimpanan penambahan 0,9% filtrat jambu biji (FJB) dalam pengencer air kelapa kuning telur hingga hari ketiga menghasilkan persentase motilitas, viabilitas, membrane plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) yang lebih tinggi dibanding kontrol.

### SARAN

Perlu penelitian lanjutan untuk uji fertilitas penggunaan suplementasi 0,9% filtrat jambu biji (FJB) dalam pengencer air kelapa+kuning telur dengan melakukan inseminasi buatan pada sapi bali akseptor di lapangan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dr. Ir. Marlene Nalley, MS dan Petrus Ikun, S.Pt yang telah banyak memberikan bantuan baik pada waktu penampungan di kandang percobaan, evaluasi spermatozoa, pengenceran dan penyimpanan semen di laboratorium serta membantu melakukan evaluasi paska pengenceran dan penyimpanan.

### DAFTAR PUSTAKA

Agarwal A, Ikemto I, Loughlin KR. 2004.

Level of reactive oxygen species before and after sperm preparation : Comparative of swim up and filtration method. *Fertility and Sterility*. 79: 829-843.

Baker MA. 2016. Proteomics of post-translational modifications of mammalian spermatozoa. *Cell Tissue Res* 363(1): 279-287.

Delgadillo JJ, Leboeuf B, Chemineau P. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum Res* 9: 47-59.

Dowling DK, Simmons W. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life history evolution. *Proc Biol Sci*. 276: 1737-1745.

Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. London. Butterworths.

Holt WV, Medrano A, Thurson LM, Watson PF. 2005. The Significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63: 370-382.

Kune P, Solihati N. 2007. Tampilan Berahi dan Tingkat Kesuburan Sapi Bali Timor yang Diinseminasi. *Jurnal Ilmu Ternak* 7(1): 1-5.

Labetubun J, Siwa IP. 2011. Kualitas Spermatozoa Kauda Epididimis Sapi Bali dengan Penambahan Laktosa atau Maltosa yang Dipreservasi pada Suhu 3-5°C. *J Veteriner* 12(3): 200-207.

Marawali A, Sinlae M. 2016. Efektivitas Pemberian á Tokoferol dalam Pengencer Air Kelapa Kuning Telur terhadap Kualitas dan Angka Kebuntingan Semen Cair Sapi Bali yang Disimpan pada Suhu 5°C. Laporan Akhir Penelitian Hibah Bersaing, Universitas Nusa Cendana.

Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition* 22(1): 18-35.

- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev* 74(7): 878-892.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36: 77-86.
- Sanoeka D, Kurpisz M. 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2 (12): 1-7.
- Sharma M, Ray K, Sharma SS, Gupta YK. 2000. Effects of Antioxidant on Pyrogallol-Induced Delay in Gastric Emptying in Rats. *Pharmacology* 60(2): 90-96.
- Shen H-H, Lithgow T, Martin LL. 2013. Reconstitution of Membrane Proteins into Model Membranes: Seeking Better Ways to Retain Protein Activities. *Int J Mol Sci* 14: 1589-1607.
- Sikka SC. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 25: 5-18.
- Sudarmaji, Malik ABD, Gunawan AAM. 2004. Pengaruh Penyuntikan Prostaglandin terhadap Persentase Berahi dan Angka Kebuntingan Sapi Bali dan PO di Kalimantan Selatan. Jurusan Peternakan, Banjarmasin. Fakultas Pertanian, Universitas Islam Kalimantan.
- Sumadisa IL, Susilawati T, Ciptadi G, Isnaini N. 2015. The potency of guava filtrate (*Psidium guajava* Linn) for preservation of Bali bull spermatozoa. *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 8(5): 51-57.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi buatan pada ternak*. Bandung. Angkasa