

Penambahan *á-tocopherol* sebagai Antioksidan pada Pengencer Tris Kuning Telur Spermatozoa Kucing pada Suhu 4°C

(ADDITION OF *Á-TOCOPHEROL* AS AN ANTIOXIDANT TO TRIS-EGG YOLK
DILUENTS OF CAT SPERMATOZOEA AT TEMPERATURE 4°C)

Titis Prastiwi¹, Wahono Esthi Prasetyaningtyas^{2*},
Ni Wayan Kurniani Karja³

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan,

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi,

³Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

*Email: wahono_esti@apps.ipb.ac.id

ABSTRAK

Stres oksidatif memiliki efek merugikan pada kualitas semen selama pengolahan semen untuk inseminasi buatan. Antioksidan *á-Tocopherol* merupakan salah satu antioksidan yang termasuk ke dalam kelompok antioksigen. Antioksidan ini dapat mengurangi aksi radikal bebas dan menurunkan stress oksidatif pada sperma. Penelitian ini bertujuan menguji efektivitas penambahan *á-tocopherol* pada pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas semen cair yang berasal dari kauda epididimis kucing. Kauda epididimis kucing didapatkan dengan metode kebiri. Kauda epididimis kemudian dipisah dan dicacah untuk mendapatkan spermatozoa kucing. Semen dengan motilitas >70% diencerkan pada kelompok pengencer tris kuning telur (TKT), tris kuning telur dengan *á-tocopherol* 0,1% (TKT+T-0,1%), tris kuning telur dengan *á-tocopherol* 0,2% (TKT+T-0,2%), dan tris kuning telur dengan *á-tocopherol* 0,3% (TKT+T-0,3%). Semen cair disimpan selama 4 hari (H0-H4) pada suhu 4°C, kemudian dilakukan evaluasi kualitasnya (motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh sperma) setiap 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan kualitas semen cair tidak berbeda signifikan pada H0 (P>0,05), tetapi penambahan *á-tocopherol* secara umum meningkatkan kualitas semen pada H4 pascapreservasi. Berdasarkan hasil penelitian, kelompok pengencer TKT+T-0,1% adalah perlakuan terbaik.

Kata kunci: antioksidan; kucing; tris kuning telur; *á-tocopherol*; radikal bebas.

ABSTRACT

Oxidative stress has detrimental effects on semen quality during semen processing for artificial insemination. The *á-Tocopherol* is an antioxidant that belongs to a group known as antioxygen. These antioxidants can reduce the action of hydrogen peroxide, leading to a decrease in sperm oxidative stress. The aim of the research was to evaluate the post-preservation quality of cat semen (motility, viability, abnormality, and membrane plasma integrity.) Semen collection was carried out by castration method then the cauda epididimis is separated and sliced to get the cat's spermatozoa. Semen with motility > 70% were grouped and diluted with different extenders; tris-egg yolk extender (TKT), tris-egg yolk extender with *á-tocopherol* 0,1% (TKT + T-0,1%), tris-egg yolk extender with *á-tocopherol* 0,2% (TKT+ T-0,2%), tris-egg yolk extender with *á-tocopherol* 0.3% (TKT+ T-0,3%). All semen samples were preserved in 4°C for 4 days (H0-H4). The semen samples were evaluated the parameter of spermatozoa immediately (motility, viability, abnormality, and membranes plasma integrity) every 24 hours. The result showed that there were no significant changes in semen quality on H0 (P>0,05). In general, the supplementation of *á-tocopherol* maintained the semen quality of H4 post-preservation. Furthermore, the result showed that TKT+T-0,1% extender is the best extender and treatment.

Keywords: antioxidant; cat; tris-egg yolk; *á-tocopherol*; free radicals

PENDAHULUAN

Kelangsungan hidup suatu spesies penting karena setiap individu mempunyai jangka waktu hidup terbatas dan hanya dengan reproduksi kelangsungan hidup dapat terjaga. Kucing termasuk dalam keluarga *Felidae*, termasuk di dalamnya spesies kucing besar seperti harimau, macan dan singa. Kucing memiliki tiga jenis genus yaitu; *Phantera*, *Felis* dan *Acinonyx* (Edwards, 2005).

Koleksi material genetik adalah salah satu upaya mengembangbiakan kucing atau hewan lain. Salah satu cara koleksi material genetik pada hewan jantan yang mati adalah koleksi semen yang berasal dari kauda epididimis (Rizal *et al.*, 2004). Semen dari kauda epididimis memungkinkan untuk dilakukan pengolahan dan penyimpanan, karena semen tersebut memiliki kualitas yang sama dengan ejakulat. Axner *et al.* (1998) menunjukkan bahwa semen dari kauda epididimis telah mengalami pematangan di bagian kaput dan korpus epididimis dan memiliki molititas yang sama seperti semen hasil ejakulasi. Spermatozoa hasil penyimpanan dapat digunakan untuk inseminasi buatan (IB), *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI), dan *in vitro embryo production* (IVEP) sehingga memperoleh individu yang baru (Yulnawati *et al.*, 2005).

Penerapan teknologi reproduksi, khususnya IB, menggunakan semen cair atau beku yang diolah dari hasil koleksi semen. Terdapat beberapa metode untuk koleksi semen, di antaranya adalah menggunakan vagina buatan, pemijatan, dan elektroejakulator, metode untuk koleksi spermatozoa bisa juga dilakukan dari kauda epididimis (Zambelli dan Cunto, 2006). Pengolahan semen menentukan kualitas semen yang digunakan untuk IB. Salah satu komponen penting yang menentukan kualitas spermatozoa adalah bahan pengencer. Komponen dalam bahan pengencer harus memenuhi kebutuhan serta fungsi fisiologis spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa dapat dipertahankan selama penyimpanan (Wicaksono dan Arifiantini, 2009). Selain itu, bahan pengencer diharapkan tidak bersifat toksik, dan dapat melindungi dari kejutan dingin baik untuk semen beku atau semen cair (Kusumawati dan Leondro, 2011).

Preservasi semen dapat menyebabkan kematian spermatozoa, karena rusaknya membran plasma spermatozoa akibat peroksidasi lipid/lemak. Peroksidasi lemak

merupakan proses kompleks yang terjadi karena reaksi *polyunsaturated fatty acid* atau asam lemak tak jenuh, fosfolipid penyusun membran sel dengan radikal bebas (Rizal *et al.*, 2009). Antioksidan merupakan molekul yang dapat menekan radikal bebas, sehingga mampu mencegah kerusakan spermatozoa dan mempertahankan kualitasnya. Antioksidan yang berasal dari luar (eksogen) dapat membantu mempertahankan kualitas spermatozoa. Salah satu antioksidan yang dapat digunakan adalah *á-tocopherol*. Antioksidan tersebut bekerja dengan menyumbang ion hidrogen, sehingga mampu mengubah radikal peroksil menjadi radikal *tocopherol* yang kurang aktif (Wardlaw dan Jeffrey, 2007), peristiwa tersebut mampu menghambat dan menekan efek kerusakan asam lemak/peroksidasi lemak (Vernet *et al.*, 2004). Penambahan *á-tocopherol* pada pengencer telah digunakan dalam kriopreservasi semen berbagai jenis ternak, yaitu kambing boer (Alawiyah dan Hartono, 2006), sapi (Dasrul *et al.*, 2012), sapi madura (Ratnani *et al.*, 2017) dan ayam pelung (Hendiyani *et al.*, 2018). Sampai saat ini, penelitian tentang penambahan *á-tocopherol* pada semen cair kucing belum banyak dilaporkan, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penambahan *á-tocopherol* pada pengenceran semen kucing dengan beberapa konsentrasi berbeda yang dipreservasi pada suhu 4°C.

METODE PENELITIAN

Koleksi Semen

Sebanyak dua puluh lima buah testis digunakan untuk penelitian ini. Testis diperoleh dari klinik hewan di Bogor dari pasien kucing yang dikebiri. Testis yang didapatkan kemudian dibawa ke laboratorium untuk diproses selanjutnya. Testis disimpan dalam NaCl fisiologis dan dibawa menggunakan *coolbox* dengan waktu perjalanan sekitar 30-45 menit dari klinik hewan ke laboratorium. Bagian kauda epididimis dipisahkan dan dibersihkan dari bagian tunica dartos dan tunica albuginea. Kemudian dilakukan pembilasan dengan cara menyemprotkan larutan NaCl fisiologis ke kauda epididimis menggunakan spuit 10 mL dan jarum berukuran 20G. Selanjutnya, testis dilakukan pencacahan dengan pisau bedah dan ditambahkan larutan PBS sebanyak 3-4 mL. Larutan yang mengandung spermatozoa

tersebut ditampung dalam tabung falcon® 15 mL, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 8 menit. Supernatan dibuang dan dilakukan penghitungan konsentrasi spermatozoa menggunakan kamar hitung Neubauer, pengamatan terhadap persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh (MPU) hari ke-0. Spermatozoa epididimis selanjutnya diencerkan dan disimpan pada suhu 4 °C selama empat hari. Suhu refrigerator diukur setiap hari menggunakan termometer.

Pembuatan Bahan Pengencer

Bahan pengencer yang digunakan terdiri dari 0,03025 g/mL *tris (hydroxymethyl) aminomethane* (Merck®), sebanyak 0,017 g/mL *citric acid monohydrate* (Merck®), 0,0125 g/mL *D (-) fructose* (Merck®), 500 IU/mL *penicillin-G* (Sigma-Aldrich®), 0, mg/mL *streptomycin sulfate* (Meiji®), dan 10 mL *mili-Q water*. Pengencer dasar tris ditambahkan kuning telur dengan perbandingan 80 : 20, dan mengandung lipoprotein dan *lechitin* sebagai pelindung membran spermatozoa terhadap efek *cold shock* (Tsutsui *et al.*, 2003a). Spermatozoa yang telah diencerkan ditambahkan *α-tocopherol* (Sigma-Aldrich®) dengan konsentrasi 0,1%, 0,2%, 0,3% dan kontrol kemudian dilakukan pemeriksaan pH dan mikroskopis.

Evaluasi Kualitas Spermatozoa yang Dievaluasi

Karakteristik kualitas spermatozoa secara mikroskopis yang dievaluasi meliputi konsentrasi, persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan membran plasma utuh (MPU) (Muhammad *et al.*, 2016). Persentase spermatozoa motil adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Motilitas spermatozoa 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% (Toelihere, 1993). Persentase spermatozoa hidup adalah persentase spermatozoa yang hidup, sedikitnya 200 spermatozoa dievaluasi dengan pewarnaan eosin-nigrosin menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Felipe *et al.*, 2008). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala yang bening, sedangkan spermatozoa yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah.

Persentase membran plasma utuh (MPU) merupakan presentase spermatozoa yang

memiliki membran plasma utuh yang dievaluasi dengan metode *hypoosmotic swelling (HOS) test* (Jeyendran *et al.*, 1984). Komposisi larutan hypoosmotik terdiri atas: 1,35 g fruktosa + 0,73 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 mL larutan hypoosmotik 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 minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus karena tidak mampu menahan cairan yang masuk ke dalam sel (Ariswan *et al.*, 2014)

Prosedur Analisis Data

Data motilitas, viabilitas, abnormalitas dan MPU spermatozoa diperoleh dari lima kali pengulangan, dianalisis dengan menggunakan uji sidik ragam satu arah/*one-way analysis of variance* (ANOVA). Data tersebut kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan dengan selang kepercayaan 95%. Uji Duncan dilakukan jika hasil uji menunjukkan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ($P < 0,05$). Analisis data dilakukan dengan menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 25.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Spermatozoa Sebelum Pengenceran

Hasil pengamatan spermatozoa yang berasal dari kauda epididimis disajikan dalam Tabel 1. Tingkat kepadatan spermatozoa di kauda epididimis masih tinggi, hal ini karena belum adanya penambahan plasma semen dari kelenjar aksesoris. Rataan konsentrasi spermatozoa kucing sebesar $147,5 \pm 54,83$ juta sel/mL setelah sentrifugasi, sebelum sentrifugasi konsentrasi spermatozoa sebesar $61,9 \pm 7,3$ juta sel/mL. Konsentrasi spermatozoa sebelum disentrifugasi sama dengan laporan Tsutsui *et al.* (2003b) yang menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa di kauda epididimis sebesar 58-64 juta sel/mL. Hasil ini juga berbeda dengan hasil yang dilaporkan oleh Yulnawati *et al.* (2005) yang menyatakan bahwa konsentrasi spermatozoa

Tabel 1. Pemeriksaan mikroskopis spermatozoa kauda epididimis kucing

Paramater Pengamatan	Hasil
Sebelum Sentrifugasi	
Motilitas (%)	74,5±0,9
Viabilitas (%)	79,7±1,9
Abnormalitas (%)	9,6±1,7
Membran Plasma Utuh (%)	77,7±1,8
Konsentrasi spermatozoa (juta sel/mL)	61,9±7,3
Setelah sentrifugasi	
Motilitas (%)	74,5±0,9
Konsentrasi spermatozoa (juta sel/mL)	143,7±33,6

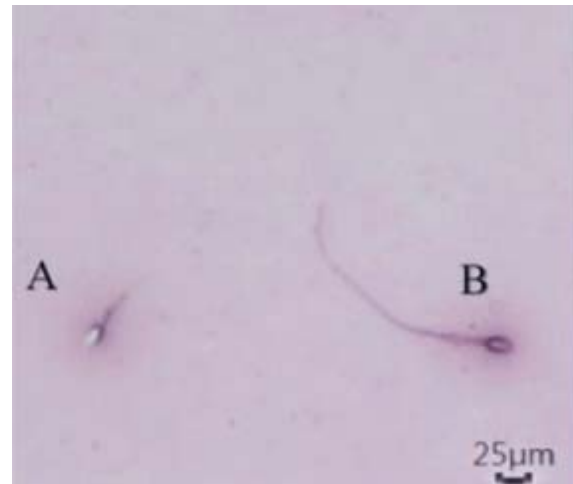
Keterangan: data disajikan dalam bentuk rerata dengan standar deviasi ($\bar{x} \pm SD$).

dari kauda epididimis kucing sebesar $108,00 \pm 81,49$ juta sel/mL. Perbedaan konsentrasi diduga akibat adanya perbedaan teknik koleksi spermatozoa, umur, dan nutrisi dari hewan tersebut (Yulnawati dan Setiadi, 2005).

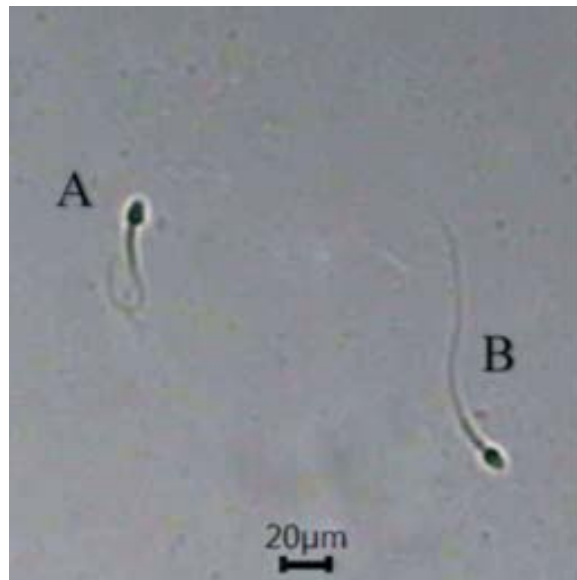
Viabilitas spermatozoa diamati dengan menggunakan pewarnaan *eosin nigrosin* (Felipe *et al.*, 2008). Spermatozoa hidup ditunjukkan dengan kepala yang bening, sedangkan spermatozoa mati dinilai dari kepala yang berwarna merah jambu/pink (Gambar 1). Hal tersebut karena membran kepala spermatozoa yang sudah mati tidak stabil sehingga mudah menyerap warna *eosin nigrosin* (Bansal dan Bilaspuri, 2008). Faktor utama yang digunakan untuk menentukan kualitas spermatozoa layak untuk dibekukan adalah viabilitas, pada penelitian ini viabilitas sebesar $79,7 \pm 1,9\%$.

Hasil pengamatan integritas membran plasma utuh (MPU) disajikan pada Gambar 2. Persentase MPU yang diperoleh sebesar $73,90 \pm 1,10\%$. Spermatozoa dalam larutan hiposmotik akan bereaksi karena larutan masuk ke dalam sel melewati membran plasma. Akibat perbedaan tekanan osmotik dari larutan tersebut dengan tekanan osmotik luar sel yang lebih rendah, sehingga larutan tersebut masuk ke dalam sel dan menyebabkan pembengkakan. Kejadian ini dapat diamati pada ekor spermatozoa yang mengalami invaginasi/melingkar. Spermatozoa dengan kerusakan fungsi membran tidak mengalami pembengkakan dan ekornya tidak mengalami invaginasi/melingkar (Jeyendran *et al.*, 1984).

Persentase motilitas spermatozoa epididimis kucing pada penelitian ini sebesar $72,00 \pm 0,94\%$, sedangkan abnormalitas spermatozoa (Gambar 3) yang ditemukan dalam penelitian ini sebesar $9,6 \pm 1,7\%$. Kualitas spermatozoa kauda epididimis kucing menunjukkan hasil yang baik dan memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut dalam bentuk semen cair. Syarat semen yang bisa diolah lebih lanjut antara lain memiliki presentase motilitas $\geq 70\%$, abnormal 6-10%, dan presentase MPU $\geq 60\%$ (Rizal, 2009).



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa kauda epididimis kucing; hidup (A), mati (B)



Gambar 2. Membran plasma utuh (MPU) kauda epididimis kucing; membran plasma utuh (A), membran plasma tidak utuh (B)

Kualitas spermatozoa dievaluasi setiap hari. Evaluasi menunjukkan kualitas spermatozoa yang menurun karena penyimpanan. Parameter motilitas spermatozoa disajikan pada Tabel 2. Motilitas spermatozoa menurun secara signifikan mulai hari ke-1 sampai hari ke-4 penyimpanan ($P < 0,05$) pada kelompok perlakuan T-0,1%, T-0,2% dan T-0,3%, sedangkan pada T-0 terjadi penurunan yang signifikan mulai hari ke-3 hingga hari ke-4. Penurunan ini kemungkinan diakibatkan adanya penumpukan asam laktat sisa metabolisme sel. Penumpukan asam laktat mengakibatkan turunnya pH medium (pengencer) menjadi asam, dan dapat menjadi racun terhadap spermatozoa yang mengakibatkan kematian spermatozoa (Sugiarti *et al.*, 2004).

Viabilitas spermatozoa pada kelompok T-0%, T-0,1%, T-0,2%, dan T-0,3% menurun secara signifikan ($P < 0,05$). Pada H0 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada setiap

kelompok perlakuan ($P > 0,05$). Viabilitas spermatozoa setelah penyimpanan selama empat hari menunjukkan kelompok T-0,1% tertinggi dan kelompok T-0,3% memiliki nilai viabilitas terendah. Kelompok T-0% dan T-0,2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Parameter viabilitas digunakan sebagai kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup. Persentase spermatozoa hidup lebih tinggi daripada persentase motilitas. Hal tersebut karena spermatozoa yang hidup belum tentu motil, tetapi jumlah spermatozoa yang tidak motil terkadang masih hidup (Campbell *et al.*, 2003). Penurunan persentase viabilitas juga dapat diakibatkan oleh pengaruh *cold shock* (Pereira *et al.*, 2010).

Membran plasma utuh (MPU) spermatozoa kauda epididimis kucing dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah *α-tocopherol* selama empat hari pada suhu 4 p C disajikan pada Tabel 4. Membran plasma utuh sper-

Tabel 2. Motilitas spermatozoa kauda epididimis kucing dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah *α-tocopherol* selama 4 hari pada suhu 4°C

Pengencer	Motilitas spermatozoa (%±SD)				
	H0	H1	H2	H3	H4
T-0	72,00±0,9a	67,20±2,1aAB	61,40±1,0aA	54,00±1,9bA	42,60±1,9cA
T-0.1%	73,00±0,4a	69,40±1,2bB	65,00±0,6cB	60,40±1,0dB	51,40±1,9eB
T-0.2%	71,20±0,7a	65,20±0,8bA	58,40±1,4cA	51,90±1,8dA	45,40±1,6eA
T-0.3%	70,80±0,5a	60,80±0,5bC	53,40±1,1cC	42,70±1,7dC	33,00±1,2eC

Keterangan: Huruf kecil (a, b, c, d, e) yang berbeda pada baris yang sama dan huruf besar berbeda (A, B, C) pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$); H0: evaluasi segera semen diencerkan; H1: evaluasi hari ke-1, H2: evaluasi hari ke-2, H3: evaluasi hari ke-3, H4: evaluasi hari ke-4.

Tabel 3. Viabilitas spermatozoa kauda epididimis kucing dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah *α-tocopherol* selama empat hari pada suhu 4°C

Pengencer	Viabilitas spermatozoa (%±SD)				
	H0	H1	H2	H3	H4
T-0	78,42±1,5a	75,92±1,1aA	70,51±1,2aAB	66,90±1,6bAB	60,31±3,0cA
T-0.1%	79,65±0,9a	78,54±0,7aA	72,41±1,7bA	71,12±2,2bB	68,04±2,3bB
T-0.2%	76,45±1,2a	71,26±1,5bB	66,66±0,7cBC	63,89±1,2cdA	61,23±2,0dA
T-0.3%	76,41±1,3a	67,01±1,7bC	62,76±1,8bcC	58,62±1,5cC	53,11±1,5dC

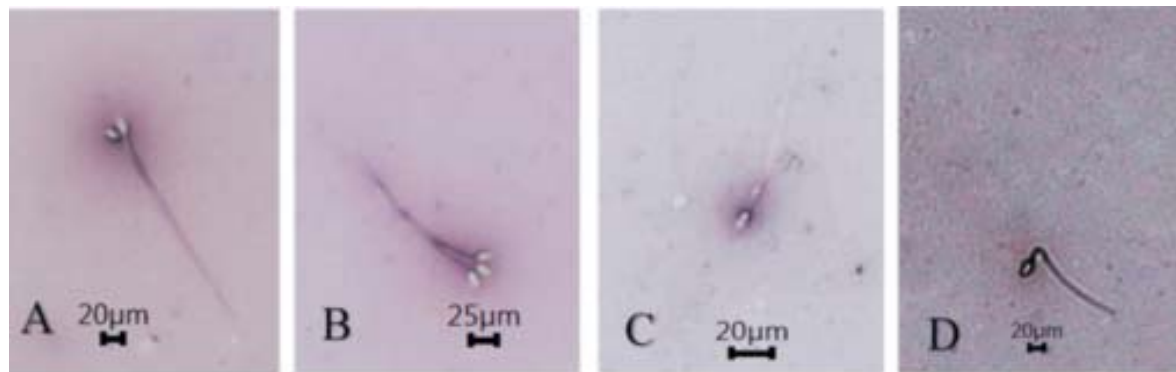
Keterangan : Huruf kecil (a, b, c, d, e) yang berbeda pada baris yang sama dan huruf besar berbeda (A, B, C) pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$); H0: evaluasi segera semen diencerkan; H1: evaluasi hari ke-1, H2: evaluasi hari ke-2, H3: evaluasi hari ke-3, H4: evaluasi hari ke-4.

matozoa pada semua kelompok menurun secara signifikan mulai hari ke-1 sampai hari ke-4 penyimpanan ($P < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian terdapat perbedaan yang nyata pada kelompok T-0% dan T-0,1% serta T-0,2% dan T-0,3% selama penyimpanan dari H0 hingga H4 ($P < 0,05$). Kemudian pada hari terakhir penyimpanan keutuhan membran plasma tertinggi yaitu terdapat pada kelompok T-0,1 dan terendah pada kelompok T-0,3. Penyimpanan selama empat hari dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang akan menyebabkan kerusakan struktur membran plasma terganggu (Suyadi *et al.*, 2015), sehingga nilai MPU naik setelah empat hari penyimpanan.

Penggunaan bahan pengencer tris kuning telur berfungsi sebagai penyangga (*buffer*) bagi pengencer, sehingga perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa dapat ditekan. Asam laktat merupakan produk sisa respirasi sel secara *anaerob*. Pengencer tris kuning telur selain sebagai *buffer* juga

mengandung fruktosa sebagai sumber energi, untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat serta mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, sumber energi dan melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Widjaya, 2011).

Spermatozoa yang disimpan pada suhu dingin menyebabkan energi yang dikeluarkan menjadi semakin banyak. Energi yang tersedia akan terkuras yang mengakibatkan spermatozoa menjadi lebih *semipermeable* terhadap elektrolit. Kejadian tersebut mengakibatkan membran sel menjadi pecah yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. *Reactive oxygen species* (ROS) dihasilkan selama metabolisme (Dutta *et al.*, 2019), apabila jumlahnya meningkat maka sistem antioksidan endogen tidak mampu mengatasinya. Menurut Alvarez dan Storey (1995) senyawa ROS dapat menyebabkan kerusakan *polyunsaturated fatty acid* yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran plasma



Gambar 3. Abnormalitas spermatozoa kauda epididimis kucing; *dichephalic* (A) *trichephalic* (B), *Cytoplasmic droplet* (C), dan ekor bengkok (D)

Tabel 4. Membran plasma utuh spermatozoa kauda epididimis kucing dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah *α-tocopherol* selama empat hari pada suhu 4°C

Pengencer	Keutuhan membran plasma spermatozoa (%±SD)				
	H0	H1	H2	H3	H4
T-0	73,90±1,1aA	71,61±0,9abA	67,22±0,7abA	64,70±0,5bcAB	59,04±2,2cA
T-0.1%	73,62±0,9aAB	72,20±0,7bA	66,96±1,0bcA	66,19±1,3cdA	64,34±1,2dB
T-0.2%	68,67±2,7aB	66,43±1,7abB	62,51±0,8abB	62,00±0,7bcBC	59,07±1,1cA
T-0.3%	66,76±1,5aB	63,85±1,7bB	61,89±1,4bB	60,73±1,0bcC	54,50±1,2cC

Catatan: Huruf kecil (a, b, c, d, e) yang berbeda pada baris yang sama dan huruf besar berbeda (A, B, C) pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$); H0: evaluasi segera semen diencerkan; H1: evaluasi hari ke-1, H2: evaluasi hari ke-2, H3: evaluasi hari ke-3, H4: evaluasi hari ke-4.

spermatozoa. Selanjutnya akan menginaktivasi enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA dan menyebabkan kematian spermatozoa. Selain itu ROS dapat menyebabkan mutasi pada DNA mitokondria, bahkan dapat merusak mitokondria sehingga menginduksi terjadinya nekrosis spermatozoa (Dutta *et al.*, 2019). Produksi ROS yang semakin tinggi menyebabkan tingkat peroksidasi lipid pada membran menjadi meningkat (Suryohudoyo, 2000).

Berdasarkan hasil penelitian penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer tris kuning telur pada konsentrasi 0,1% memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan motilitas, viabilitas, dan MPU, sedangkan konsentrasi 0,3% memberikan hasil terendah. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer semen berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa kauda epididimis kucing. Menurut Comb (1992) *α-tocopherol* mempunyai fungsi yang penting untuk memelihara integritas membran pada seluruh sel tubuh. Antioksidan *α-tocopherol* bertindak sebagai pemutus berbagai reaksi rantai ROS karena kemampuannya untuk memindahkan *hydrogen fenolat* kepada radikal bebas peroksid dari asam lemak tak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi (Mayes, 1995).

Penambahan *α-tocopherol* 0,1% merupakan dosis optimum di dalam pengencer kuning telur, sehingga dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Keadaan tersebut diduga karena penambahan *α-tocopherol* menyebabkan optimalisasi laju fruktolisis sehingga kebutuhan energi untuk motilitas dapat terpenuhi. Selain itu, *α-tocopherol* diduga mampu mengikat oksigen reaktif yang terdapat dalam sel sehingga

dapat mencegah terbentuknya peroksidasi lipid yang dapat menghambat glikolisis dan motilitas spermatozoa (Dasrul *et al.*, 2012). Antioksidan *α-tocopherol* mampu menangkap senyawa oksigen reaktif (ROS) pada pengencer. Menurut Bansal dan Bilaspuri (2008) antioksidan *α-tocopherol* bereaksi dengan menyumbangkan satu atom hidrogen dari gugus OH ke senyawa radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan, sehingga menyebabkan terbentuknya radikal tokoferoksil yang bersifat tidak merusak dan stabil, sehingga dapat menghentikan tahap proses propagasi berantai. Kejadian peroksidasi lipid dapat menyebabkan rusaknya membran plasma (Dasrul *et al.*, 2012). Kerusakan membran plasma spermatozoa dapat menurunkan fluiditas membran yang berfungsi sebagai sarana transportasi substrat sumber energi seperti fruktosa masuk ke sel untuk dimetabolisir (fruktolisis) menjadi energi dalam bentuk ATP yang digunakan untuk pergerakan spermatozoa. Energi dalam bentuk ATP akan menurun sehingga motilitas menurun bahkan dapat menimbulkan kematian spermatozoa. Penambahan *α-tocopherol* dapat mempertahankan dan melindungi membran sel dari serangan senyawa oksigen reaktif. Antioksidan *α-tocopherol* juga berfungsi sebagai antioksidan intraseluler yang paling kuat, dalam mengurangi atau mencegah peroksidasi lipid tak jenuh di dalam dan pada dinding sel (Suryohudoyo, 2000). Keberadaan antioksidan di dalam pengencer akan meningkatkan kualitas spermatozoa selama preservasi (Ghallab *et al.*, 2017).

Konsentrasi *α-tocopherol* yang semakin meningkat juga menyebabkan *α-tocopherol* beralih fungsi sebagai pro-oksidan bukan antioksidan (Tariq *et al.*, 2015). Hal tersebut

Tabel 5. Abnormalitas spermatozoa kauda epididimis kucing dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah *α-tocopherol* selama empat hari pada suhu 4°C

Pengencer	Abnormalitas spermatozoa (%±SD)				
	H0	H1	H2	H3	H4
T-0	10,00±0,6a	11,54±1,2abA	12,30±1,2abA	13,32±0,9bcA	15,10±1,0cA
T-0.1%	8,93±0,6a	11,81±0,5bAB	12,68±0,4bcA	13,84±0,6cdA	15,34±0,6dAB
T-0.2%	10,45±0,8a	12,50±0,4bAB	13,50±0,4bAB	14,97±0,3cAB	17,10±0,3dBC
T-0.3%	11,40±1,3a	13,86±0,4abB	14,88±0,1abB	15,90±0,2bcB	17,46±0,2cC

Catatan: Huruf kecil (a, b, c, d, e) yang berbeda pada baris yang sama dan huruf besar berbeda (A, B, C) pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$); H0: evaluasi segera semen diencerkan; H1: evaluasi hari ke-1, H2: evaluasi hari ke-2, H3: evaluasi hari ke-3, H4: evaluasi hari ke-4.

diakibatkan oleh produksi radikal bebas yang meningkat ataupun produk antioksidan rendah, sehingga menyebabkan keseimbangan yang mengarah pada prooksidan yang dapat meningkatkan stres oksidatif. Dampak dari stres oksidatif yaitu dapat menurunkan kualitas sperma, penurunan motilitas spermatozoa dan meningkatkan jumlah spermatozoa mati (Hendiyani *et al.*, 2018). Selain itu, penambahan *á-tocopherol* pada konsentrasi tinggi menyebabkan konsentrasi pengencer semakin pekat dan pengencer menjadi hipertonic. Kondisi ini menyebabkan metabolisme spermatozoa menjadi terhambat dan mengakibatkan spermatozoa kehilangan energi. Kondisi kehilangan energi diawali dengan berkurangnya produksi energi untuk bergerak sehingga motilitas spermatozoa menurun dan apabila kondisi tersebut terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Hartono, 2008).

Persentase abnormalitas spermatozoa kauda epididimis kucing dengan pengencer tris kuning telur yang ditambah *á-tocopherol* selama penyimpanan empat hari pada suhu 4 p C disajikan pada Tabel 5. Abnormalitas pada kelompok T-0%, T-0,1%, T-0,2%, dan T-0,3% meningkat secara signifikan dari hari ke-1 sampai hari ke-4 penyimpanan ($P < 0,05$). Penyimpanan pada H0 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada setiap kelompok perlakuan ($P > 0,05$). Berdasarkan hasil penyimpanan nilai abnormalitas terendah atau yang memiliki jumlah spermatozoa normal paling tinggi terdapat pada kelompok perlakuan kontrol. Abnormalitas dapat terjadi selama proses spermatogenesis, selama perjalanan spermatozoa di epididymis, atau dalam proses preservasi (Parkinson, 2004). Beberapa spermatozoa memiliki abnormalitas pada kepala dan ekor, antara lain *trichcephalic* sedangkan kelainan pada ekor yaitu adanya ekor bengkok dan *cytoplasmic droplet* (Gambar 3). Secara normal spermatozoa asal kauda epididymis sering ditemukan abnormalitas *cytoplasmic droplet* (Kauster *et al.*, 2004). Peningkatan jumlah abnormalitas *cytoplasmic droplet* selama preservasi disebabkan oleh suhu yang dingin (Mekasha *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil penelitian tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok pemberian *á-tocopherol*. Hartono (2008) menyatakan bahwa penambahan antioksidan dalam pengencer tidak memengaruhi persentase abnormalitas spermatozoa.

SIMPULAN

Penambahan *á-tocopherol* 0,1% dalam pengencer tris kuning telur setelah penyimpanan pada suhu 4°C selama empat hari, merupakan kelompok perlakuan terbaik dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh spermatozoa kucing yang dikoleksi dari kauda epididimis pada penyimpanan suhu 4°C.

SARAN

Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut mengenai efektivitas penambahan *á-tocopherol* pada pengencer semen cair terhadap keberhasilan program IB.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Bedah Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi FKH IPB, yang membantu menyediakan epididymis dan testis kucing hasil kebiri yang digunakan untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Alawiyah D, Hartono M. 2006. Pengaruh penambahan vitamin E pada pengencer sitrat kuning telur terhadap kualitas semen pada kambing Boer. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 31(1): 8-14.
- Alvarez JG, Storey. 1995. Differential incorporation of fatty acid into and peroxidative loss of fatty acid from phospholipid of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 42: 334-345
- Ariswan, Saili T, Baa LO, Rahadi S. 2014. Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing peranakan etawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis* 1(1): 79-87.
- Axner E, Strom B, Linde FC. 1998. Morphology of spermatozoa in the cauda epididymis before and after electroejaculation twice

- during the same period of anesthesia. *Therogenology* 50: 973-979.
- Bansal AK, Bilaspuri GS. 2008. Effect of manganese on bovine sperm motility, viability and lipid peroxidation *in vitro*. *Journal of Animal Reproduction* 5(3): 90-96.
- Campbell JR, Campbell KL, Kanealy MD. 2003. Artificial insemination. In: *Animal Science*. 4th (Ed). New York (USA). Edward Arnold Publisher Ltd. Hlm. 431.
- Combs GF Jr. 1992. *The vitamins fundamental aspects in nutrition and health*. California (USA). Academic Press Inc. Hlm. 66.
- Dasrul, Rasmamaidar, Harris A. 2012. Efektivitas penambahan vitamin E (*α-tocopherol*) dalam medium pencucian sperma dengan sentrifugasi terhadap kualitas spermatozoa Sapi Brahma. *Agripet*. 12(2): 7-13
- Dutta S, Majzoub A, Asgarwal A. 2019. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology* 17(2): 87–97.
- Edwards. 2005. *Cat breeds and cat cares*. London (UK). Hermes Home. Hlm. 90-94
- Felipe YE, Juarez M, Hernandez G, Velancia. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compred by staining techniques. *Acta Veterinaria Brasilica* 2: 123-130.
- Ghallab ARM, Abdallah MS, Aya MF, Ayoub MM, Adel RM. 2017. Impact of supple mentation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology* 79: 14-20.
- 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.
- Hendiyani M, Bebas W, Budiassa MK. 2018. Penambahan *alfa tocopherol* dalam pengenceran terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam pelung pada suhu 4 p C. *Medicus Veterinus Indonesia* 7(2): 168-176.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez PM, Crabo BG, Zenevald LJ. 1984. Deveopment of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproduction Fertile*. 70: 219-228.
- Kauster CE, Hess RA, Althouse GC. 2004. Immunofluorescence reveals ubiquitination of retained distal cytoplasmic droplets on ejaculated porcine spermatozoa. *Journal of Andrology* 25: 340-347.
- Kusumawati ED, Leondro. 2011. Kualitas semen segar sapi pejantan pada penyimpanan dan lama simpan yang berbeda. *Jurnal Sains Veteriner* 15(1): 433-439.
- Mayes PA. 1995. *Struktur dan fungsi vitamin yang larut dalam lemak*. Jakarta (ID): Buku Kedokteran EGC. Hlm. 620
- Mekasha Y, Tegegne A, Rodrigues M. 2007. Sperm morphology attributes in indigenous male goat raised under extensive husbandry in Euthopia. *Animal Reproduction* 4: 15-22.
- Muhammad D, Susilawati T, Wahjuningsih. 2016. Pengaruh penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi FH (*Frisian Holstein*) kualitas rendah selama penyimpanan suhu 4-5 p C. *Jurnal Ternak Tropika* 17(1): 66-76.
- Parkinson TJ. 2004. Review: Evaluation of fertilitation in infertility in natural service bulls. *The Veterinary Journal* 168: 215-229.
- Pereira GR, Siqueira B, Ferreira R, Severo CK, Truzzi VS, Oliveira JEC, Goncalves PBD. 2010. Assesment of bovine spermatozoa viability using different cooling protocols prior to cryopreservation. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 9(4): 234-237.
- Rasul A, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *Journal of Andrology* 22: 278-283.
- Ratnani H, Ihsan MN, Ciptadi G, Sayudi S. 2017. Effect of *α-tocopherol* supplementation in the extender on the sperm quality of Maduran bull before anda after quick freezing. *International Journal of Advanced Research* 3(7): 1378-1389.

- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang PZ. 2004. Pengaruh waktu penyimpanan epididimis pada suhu 5°C terhadap kualitas spermatozoa epididimis domba garut. *Jurnal Veteriner* 5(3): 95-103.
- Rizal M. 2009. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi bali yang dipreservasi pada suhu 3-5 p C dalam pengencer tris dngan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 14(2): 142-149.
- Sugiarti TE, Triwulaninningsih, Situmorang P, Sianturi, Kusumaningrum DA. 2004. Penggunaan katalase dalam Produksi Semen Sapi. Prosiding Seminar Nasional Teknologi peternakan dan Veteriner. Bogor 4-5 Agustus 2004. . Puslitbang Peternakan.
- Suryohudoyo. 2000. *Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta. CV Sagung Seto. Hlm. 31-47.
- Suyadi TE, Susilorini, Amalta L. 2015. Kualitas semen kambing peranakan etawah dalam pengencer tris terhadap kualitas semen kambing peranakan etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3(4): 22-24.
- Tariq M, Khan MS, Shah MG, Nisha AR, Umer M, Hasan SM, Rahman A, Rabbani I. 2015. Exogenous antioxidants inclusion during seme cryopreservation of farm animals. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 7(3): 2273-2280.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung. Angkasa. Hlm. 146-149
- Tsutsui T, Wada M, Anza M, Hori T. 2003a. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65 (3): 397-399.
- Tsutsui T, Mikasa Y, Sugiwawa H, Kirihara N, Hori T, Kawakami E. 2003b. Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65(3): 307-312.
- Vernet P, Aitken RJ, Drewer JR. 2004. Antioxidant strategies in the epidymidis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 216(1-2): 31-39.
- Wardlaw GM, Jeffrey SH. 2007. *Perspectives in nutrition*. 7th edition. New York (USA). Mc Graw Hill Companies Inc. Hlm. 318-320
- Widjaya N. 2011. Pengaruh pemberian susu skim dengan pengencer tris kuning telur terhadap daya tahan hidup spermatozoa sapi pada suhu penyimpanan 5 p C. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 9(2): 72-76.
- Wicaksono A, Arifiantini RI. 2009. Uji banding empat bahan pengencer untuk preservasi semen anjing retriever. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 14: 50-57.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4 p C. *Majalah Kedokteran Hewan* 21(3): 100-101.
- Yulnawati, Setiadi MA, Herdis. 2005. Pemanfaatan sari buah melon dan sari wortel sebagai media pengencer alternatif semen cair domba Garut. *Majalah Kedokteran Hewan* 12: 151-160.
- Zambelli D, Cunto M. 2006. Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology* 66: 159–165.