

TESIS

**PENGARUH PENAMBAHAN LESITIN KEDELAI PADA
PENGECER TRIS DALAM MEMPERTAHANKAN
KUALITAS SEMEN SAPI BALI SELAMA
KRIOPRESERVASI**

*THE EFFECT OF SOYBEAN LECITHIN ON TRIS DILUENT IN
MAINTAINING THE QUALITY OF BALI BULL SEMEN DURING
CRYOPRESERVATION*

**ZAHRA JINAN FADILLA
I012212027**



**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

**PENGARUH PENAMBAHAN LESITIN KEDELAI PADA PENGECER
TRIS DALAM MEMPERTAHANKAN KUALITAS SEMEN SAPI BALI
SELAMA KRIOPRESERVASI**

Disusun dan diajukan oleh

**ZAHRA JINAN FADILLA
I012212027**



**PROGRAM STUDI MAGISTER
ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

PENGARUH PENAMBAHAN LESITIN KEDELAI PADA PENGECER TRIS DALAM MEMPERTAHANKAN KUALITAS SEMEN SAPI BALI SELAMA KRIOPRESERVASI

Disusun dan diajukan oleh

Zahra Jinan Fadilla
NIM. 1012212027

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Ilmu dan Teknologi
Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin
Pada tanggal 25 Januari 2024
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Pembimbing Utama

Pembimbing Anggota



Prof. Ir. Muhammad Yusuf, S.Pt., Ph.D., IPU
NIP. 19700725 199903 1 001



Prof. Dr. Ir. Abd. Latief Toleng, M.Sc
NIP. 19540602 197802 1 001

**Ketua Program Studi
Ilmu dan Teknologi Peternakan**

**Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Hasanuddin**



Prof. Dr. Ir. Ambo Ako, M. Sc., IPU
NIP. 19641231 198903 1 026



Dr. Syahdar Baba, S.Pt., M.Si
NIP. 19731217 200312 1 001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Zahra Jinan Fadilla
Nomor Induk Mahasiswa : I012212027
Program Studi : Ilmu dan Teknologi Peternakan
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

PENGARUH PENAMBAHAN LESITIN KEDELAI PADA PENGECER TRIS DALAM MEMPERTAHANKAN KUALITAS SEMEN SAPI BALI SELAMA KRIOPRESERVASI

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain. Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 31 Januari 2024
Yang Menyatakan



Zahra Jinan Fadilla

ABSTRAK

ZAHRA JINAN FADILLA. I012212027. Pengaruh Penambahan Lesitin Kedelai Pada Pengencer Tris Dalam Mempertahankan Kualitas Semen Sapi Bali Selama Kriopreservasi. Pembimbing utama **Muhammad Yusuf** dan pembimbing anggota **Abd Latief Toleng**.

Kedelai berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler yang menjaga integritas membran sel sperma dengan kandungan utamanya, yaitu Lesitin. Lesitin dari kedelai melindungi sel sperma dari dampak dingin dan mengurangi stres oksidatif selama proses kriopreservasi. Semen sapi Bali ditampung menggunakan metode vagina buatan dengan frekuensi penampungan empat kali dalam seminggu. Semen diencerkan dengan Tris Aminomethan dan ditambahkan bubuk Lesitin Kedelai P1 (1%), P2 (3%), dan P3 (5%). Pengujian kontrol terdiri dari Andromed (K1) sebagai kontrol positif dan Tris tanpa Lesitin Kedelai (K2) sebagai kontrol negatif. Parameter yang diamati diantaranya ada motilitas individu, motilitas progresif, pola pergerakan, viabilitas, integritas membran, dan integritas akrosom. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengenceran semen dengan Lesitin Kedelai sebelum dan setelah pembekuan tidak menunjukkan perbedaan signifikan antar perlakuan, tetapi rata-rata tertinggi tercatat pada perlakuan P2, dibandingkan dengan K1, K2, P1, dan P3. Sementara itu, pola pergerakan yang terdiri dari rata-rata kecepatan (VAP), kecepatan kurva (VCL), kecepatan lurus (VSL), rata-rata jarak (DAP), jarak kurva (DCL), dan jarak lurus (DSL) menunjukkan peningkatan rata-rata setelah proses pembekuan pada P3, sedangkan K1, K2, P1, dan P2 mengalami penurunan yang signifikan setelah pembekuan atau berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan P3. Kesimpulannya, semen sapi Bali yang diencerkan dengan 1% dan 3% Tris Lesitin Kedelai menghasilkan karakteristik yang baik, menjaga motilitas, viabilitas, MPU, dan TAU setelah pembekuan. Pada parameter pola pergerakan sperma, sperma yang bergerak secara progresif terlihat pada penambahan Lesitin Kedelai dengan konsentrasi 5%.

Kata Kunci : Lesitin Kedelai; Kriopreservasi; Semen Sapi Bali; Karakteristik Sperma; Pola Pergerakan

ABSTRACT

ZAHRA JINAN FADILLA. I012212027. The Effect Of Soy Lecithin On Tris Diluent In Maintaining The Quality Of Bali Bull Semen During Cryopreservation. Supervised by **Muhammad Yusuf** and **Abd Latief Toleng**.

Soy acts as an extracellular cryoprotectant that maintains membrane integrity sperm cell with their main content, Lecithin. Lecithin from Soy can protects cells from the impact of cold and reduces oxidative stress during the cryopreservation process. Bali bull semen is carried out using the artificial vagina method with a frequency of collection four times a week. Semen was diluted with Tris Aminomethan and added Soy Lecithin powder P1 (1%), P2 (3%), and P3 (5%). Control testing involved andromed (K1) as positive control and Tris without Soy Lecithin (K2) as negative control. The parameters observed included individual motility, progressive motility, movement pattern, viability, membrane integrity, and acrosome integrity. The results showed that dilution of semen with Soy Lecithin before and after freezing did not show significant differences between the treatments, but the highest average was recorded in P2 compared to K1, K2, P1, and P3. Meanwhile, the movement patterns of Velocity Average Path (VAP), Velocity Curvelinear (VCL), Velocity Straightline (VSL), Distance Average Path (DAP), Distance Curveline (DCL), and Distance Straightline (DSL) showed an increase in average after the freezing process in P3, while K1, K2, P1, and P2 experienced a significant decrease after freezing or significantly different ($P < 0.05$) from P3. In conclusion, Bali bull semen diluted with P2 3% Soy Tris Lecithin produced good characteristics, maintains motility, viability, membrane plasma integrity, and acrosome integrity after freezing. On the sperm kinematics parameter, the best progressive movement was seen in 5% of Soy Lecithin.

Keywords: Soybean Lecithin, Cryopreservation, Bali Bull Semen, Characteristics Sperm, Kinematics

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Puji syukur atas ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan seluruh rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis penulis sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar magister pada Ilmu dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin. Semoga dengan adanya tesis ini yang berjudul "**Pengaruh Penambahan Lesitin Kedelai Pada Pengencer Tris Dalam Mempertahankan Kualitas Semen Sapi Bali Selama Kriopreservasi**" dapat memberikan banyak manfaat kepada setiap orang yang membacanya.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya berkat bantuan, dukungan, doa, serta motivasi dari berbagai pihak yang penulis hanturkan dengan segala keikhlasan dan kerendahan hati kepada:

1. Kedua orang tua penulis ayahanda dan ibunda tercinta **Muhammad Siarah** dan **Ummy Riasari**, yang senantiasa mendoakan penulis dan memberikan dukungan yang tiada hentinya sehingga dapat menyelesaikan penulisan makalah ini. Untuk kakak dan adek tercinta **Sasqia Fesanti Utami** dan **Muhammad Fachrul Rochman**, keluarga besar **Arief Hasanuddin** yang turut memberi dukungan maupun mendoakan penulis.
2. **Prof. Ir. Muhammad Yusuf, S.Pt., Ph.D., IPU.**, sebagai pembimbing utama dan **Prof. Dr. Ir. Abd Latief Toleng, M.Sc.**, selaku pembimbing anggota yang telah memberikan pengarahan dan membantu penulis dalam penyusunan tesis ini;
3. **Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DEA, DES.**, **Prof. Dr. Ir. Sudirman Baco, M.Sc** dan **Prof. Dr. Ir. Rr. Sri Rachma A. Bugiwati, M.Sc**, sebagai

penguji yang telah bersedia dalam memberikan saran dan masukan untuk penyusunan tesis ini;

4. **Athhar Manabi Diansyah, S.Pt** dan **Masturi, S.Pt., M.Si**, telah memberikan ilmu dan waktunya untuk membimbing penulis dalam menyusun tesis ini.
5. Adik-adik PKL **Reskiyanti, Lidya Astuti, Ahmad Hilal** dan **Budi Utomo**, yang telah membantu penulis selama penelitian.
6. Teman seperjuangan **Yohana Fransiska Desi, S.Pt., Nurhasmiati, S.Pt., A. Tifal Nurgina, S.Pt., Andri Tamiyadi, S.Pt** dan selaku **Keluarga Cemara** yang namanya tidak dapat penulis sebutkan satu persatu dan telah senantiasa membantu dan memberikan dukungan kepada penulis;
7. Teman-teman **GRIFIN 17** dan Teman-teman **Program Studi Magister Ilmu dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin Angkatan 2021-2** yang telah membantu penulis selama perkuliahan dan senantiasa memberi dukungan kepada penulis.

Serta semua pihak yang telah turut membantu dalam menyelesaikan makalah usulan penelitian dan tidak dapat saya sebut satu persatu. Semoga makalah ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan bagi penulis sendiri.

Makassar, Januari 2024

Zahra Jinan Fadilla

DAFTAR ISI

HASIL SAMPUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Kegunaan Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Kriopreservasi dan Krioprotektan.....	5
B. Faktor yang Mempengaruhi Kriopreservasi Sperma.....	6
C. Tinjauan Umum Pengencer	8
D. Tinjauan Umum Kedelai.....	9
E. Kedelai Sebagai Pengencer.....	10
F. Penggunaan Lesitin Kedelai untuk Kriopreservasi.....	12
G. Kerangka Pikir	12
BAB III MATERI DAN METODE	16
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	16
B. Materi Penelitian.....	16
C. Prosedur Penelitian	17
D. Metode Pelaksanaan.....	18
E. Rancangan Percobaan.....	21
F. Parameter yang diamati	21
G. Analisis Data	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	28
A. Kualitas Semen Segar	28
B. Kualitas Semen Sebelum dan Setelah Kriopreservasi	31
C. Pola Pergerakan Semen Sapi Bali Setelah Kriopreservasi	37
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	46
A. Kesimpulan	46
B. Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47
LAMPIRAN	
RIWAYAT HIDUP	

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Kualitas Semen Segar Sapi Bali.....	28
Tabel 2. Motilitas Semen Sebelum dan Setelah Thawing.....	32
Tabel 3. Viabilitas Semen Sebelum dan Setelah Thawing.....	33
Tabel 4. MPU Semen Sebelum dan Setelah Thawing.....	35
Tabel 5. TAU Semen Sebelum dan Setelah Thawing.....	36
Tabel 6. Kecepatan Pergerakan Spermatozoa.....	39
Tabel 7. Jarak Tempuh Pergerakan Spermatozoa.....	43

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian.....	15
Gambar 2. Prosedur Kerja Kriopreservasi dan Evaluasi Semen Cair.....	17
Gambar 3. Pola Pergerakan Spermatozoa 1.....	26
Gambar 4. Pola Pergerakan Spermatozoa 2.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Dokumentasi.....	59
Lampiran 2. Hasil Olah Data SPSS.....	61

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu contoh penerapan bioteknologi reproduksi yang dapat mempermudah distribusi semen dari pejantan unggul sehingga mampu meningkatkan produksi dan mutu genetik ternak (Novita et al., 2019). Salah satu tahapan penting dalam IB yaitu pengawetan semen, hasil semen yang diawetkan disebut semen beku. Keuntungan utama dari semen beku yaitu dapat mengatasi hambatan waktu dan jarak sehingga dapat digunakan kapan dan dimana saja (Herdis et al., 1998). Keberhasilan IB sangat bergantung pada kualitas semen beku yang akan digunakan (Garner and Hafez., 2016). Kualitas semen pada setiap bangsa dan masing-masing ternak berbeda-beda yang dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya genetik, umur, bangsa ternak dan variasi individu (Cotter et al., 2005).

Proses kriopreservasi semen (pembekuan) menggunakan suhu yang sangat rendah (-196°C), menyebabkan pembentukan kristal es dan perubahan konsentrasi elektrolit intraseluler pada spermatozoa. Kualitas sperma dapat dipertahankan daya fertilitasnya dengan memperhatikan konsentrasi krioprotektan, waktu equilibrasi dan suhu yang digunakan untuk penyimpanan (Seshoka et al., 2016). Pemilihan jenis pengencer yang tepat merupakan salah satu cara untuk mengurangi kerusakan akibat adanya proses kriopreservasi (Surachman et al., 2006). Pengencer semen harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, anti *cold shock*, antibiotik dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa dalam proses pendinginan dan pembekuan (Susilawati., 2013).

Pengencer umum yang paling sering digunakan yaitu Andromed, Andromed adalah salah satu pengencer komersial yang praktis karena siap pakai, mengandung lesitin nabati dari ekstrak kacang kedelai, phospholipid, Tris (*hydroxymethyl*) aminomethane, asam sitrat, fruktosa, gliserol, lesitin, *tylosine tart rat*, *getnamycin sulfat*, *spectinomycin* dan *lincomycin* (Minitub., 2001). Pengencer Andromed termasuk mahal dan merupakan produk impor sehingga perlu mencari pengencer alternatif yang lebih baik dari Andromed yaitu dengan memanfaatkan bahan lokal yang harganya lebih terjangkau serta dapat mempertahankan kualitas spermatozoa agar tetap baik (Fika et al., 2014) Selain Andromed, pengencer yang umum digunakan yaitu Tris dan Asam Sitrat, karena memiliki peran sebagai larutan penyangga (*buffer*) (Susilawati dan Yekti., 2018).

Pengencer Tris Aminomethan mengandung zat yang diperlukan oleh spermatozoa sebagai sumber makanannya seperti fruktosa, laktosa, rafinosa, asam-asam amino dan vitamin (Devita et al., 2015). Selain itu, proses kriopreservasi melibatkan krioprotektan di dalam larutan pengencernya. Krioprotektan berdasarkan daya permeabilitas membrannya terbagi menjadi dua jenis. Krioprotektan intraseluler merupakan suatu zat yang mampu keluar masuk membran sel dan memiliki ukuran molekul kecil contohnya gliserol, *dimethylsulfoside* (DMSO), *ethylene glikol* (EG) dan *propanediol*. Gliserol ($C_3H_5(OH)_3$) merupakan krioprotektan intraseluler yang paling banyak digunakan untuk kriopreservasi semen (Leboeuf et al., 2000).

Krioprotektan ekstraseluler memiliki ukuran molekul besar sehingga tidak dapat menembus membran sel contohnya fruktosa, sukrosa, protein, lipoprotein, kuning telur dan susu (Herdis and Darmawan., 2013). Kuning telur merupakan krioprotektan yang paling umum digunakan dalam campuran pengencer berbasis Tris hingga 20% (Aires et al., 2003). Kandungan lesitin pada kuning telur bersifat sebagai membran *coating* dan dapat mempertahankan konfigurasi *phospholipid*

bilayer yang merupakan penyusun utama dari membran spermatozoa. Namun, kuning telur memiliki risiko kontaminasi mikroorganisme seperti bakteri dan jamur (Gil et al., 2003). Menurut Bousseau et al (1998) pengencer dengan kuning telur terkontaminasi oleh bakteri atau mycoplasma sebanyak 10-60 CFU/ml Froning (1987) melaporkan bahwa telur ayam ras mengandung *Salmonella typhimurium* mencapai 67,09 CFU/ml. Selain itu penggunaan kuning telur dapat menyebabkan kekeruhan pada bahan pengencer semen.

Pemilihan bahan pengencer yang baik dapat berpengaruh bagi kehidupan spermatozoa sehingga dapat menghasilkan kualitas semen yang berkualitas. Bahan pengencer yang dapat sebagai pengencer yaitu kacang kedelai, sebab pengencer yang berasal dari kedelai ini dapat menghindari kontaminasi mikroorganisme. Selain itu, kedelai dapat berperan sebagai krioprotektan nabati yang termasuk pada krioprotektan ekstraseluler yang bebas patogen. Secara alamiah, kedelai mengandung lesitin sebanyak 1,48 – 3,08% dan dapat menjadi sumber lesitin pada bahan pengencer yang baik (Aku et al., 2007). Hasil penelitian (Thun et al., 2002) melaporkan bahwa lesitin pada kedelai sama persis dengan lesitin yang ada pada kuning telur, mampu melindungi semen dari cekaman dingin (*cold shock*) dan mampu mengurangi stress oksidative selama kriopreservasi (Ogbuewu et al., 2010). Hasil penelitian White (1993) dan Toelihere (1985) menyebutkan lesitin pada pengencer akan berikatan dengan membran plasma, dan mempertahankan integritas membran plasma pada saat kriopreservasi.

Penggunaan lesitin kedelai dalam pengencer telah banyak dicobakan pada beberapa jenis ternak untuk kriopreservasi. Hasil penelitian (Veerasingam and Kusumawati, 2018) melaporkan persentase motilitas tertinggi post thawing semen sapi PO dengan penambahan 2% lesitin kedelai yaitu $73,6 \pm 2,1\%$, dibandingkan dengan penggunaan kuning telur yaitu hanya $69.0 \pm 2.27\%$. (Xin Yi

and Kusumawati., 2018) melaporkan persentase viabilitas tertinggi dengan lesitin kedelai 2% yaitu $71,4 \pm 4,5\%$ dibandingkan pada kuning telur $65,54 \pm 5,82\%$. Penelitian tentang berapa konsentrasi lesitin kedelai yang optimal dalam pengencer Tris untuk Sapi Bali dan pengaruhnya dalam mempertahankan kualitas semen selama kriopreservasi masih sangat terbatas. Oleh karena itu dibuatnya penelitian dengan judul “Pengaruh Penambahan Lesitin Kedelai Pada Pengencer Tris Dalam Mempertahankan Kualitas Semen Sapi Bali Selama Kriopreservasi”.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan permasalahan penelitian yaitu : Apakah penambahan lesitin kedelai dengan level berbeda dapat mempertahankan kualitas semen Sapi Bali selama kriopreservasi ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh berbagai level pengencer lesitin terhadap kualitas semen sapi Bali selama kriopreservasi.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan tambahan informasi serta bahan kajian bagi ilmu pengetahuan dan teknologi. Bagi peternak sapi atau inseminator agar dapat menggunakan bahan pengencer alternatif dari lesitin kedelai yang dapat meningkatkan kualitas dari usaha peternakan sapi dan meningkatkan nilai ekonomi bagi masyarakat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Kriopreservasi dan Krioprotektan

Secara teoritis, kriopreservasi berasal dari kata *krio* yang berarti beku, dan *preservasi* yang berarti penyimpanan pada temperature rendah. Prinsip utama kriopreservasi adalah pengeluaran air dalam sel spermatozoa atau dikenal dengan proses dehidrasi sebelum terjadi kriopreservasi intraseluler. Bila tidak terjadi proses dehidrasi maka akan terbentuk kristal es dalam jumlah yang besar, namun jika terjadi dehidrasi yang hebat maka sel akan krenasi yang berujung pada kematian (*plasmolysis*) (Supriatna and Pasaribu, 1992).

Kriopreservasi pada sperma adalah suatu proses untuk membekukan dengan tujuan untuk memperpanjang masa simpan sperma. Manfaat kriopreservasi ini adalah untuk menyediakan semen yang akan digunakan dalam inseminasi buatan (Westfalewicz et al., 2015). Manfaat lain dari kriopreservasi semen diantaranya yaitu efisiensi penggunaan pejantan, inseminasi buatan tidak dibatasi waktu dan tempat, dapat memudahkan transportasi, lebih ekonomis, dan mempunyai daya simpan yang Panjang (Layek et al., 2016). Prosesnya meliputi: a) dehidrasi, yaitu proses pergantian cairan sitoplasma dengan larutan krioprotektan melalui proses difusi kedalam sel; b) kriopreservasi, tahapan pada saat sel atau organ dan larutan berada dalam nitrogen cair (-196 °C) dan membentuk padatan; c) *warming*, yaitu tahap terjadinya perubahan kembali bentuk padatan menjadi cair ; serta d) rehidrasi, yaitu proses masuknya kembali air ke dalam sel untuk menggantikan kedudukan krioprotektan (Valojerdi et al., 2009).

Krioprotektan merupakan zat kimia non-elektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama kriopreservasi, diantaranya pengaruh

larutan pengencer maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan (Supriatna and Pasaribu., 1992). Penambahan krioprotektan bertujuan untuk memelihara keutuhan membran sel serta menyebabkan tekanan osmotik pada media sehingga cairan di dalam sel dapat mengalir keluar dan dehidrasi sel dapat terjadi (Kostaman et al., 2011). Pada proses kriopreservasi maka diperlukan krioprotektan yang dapat mengatasi atau mengurangi kejutan dingin dan pembentukan kristal es.

Berdasarkan sifat-sifat fisik kimia dan daya permeabilitas membran maka krioprotektan dibagi atas dua kelompok, yaitu krioprotektan intraseluler yang dapat keluar masuk membran karena memiliki berat molekul kecil sehingga bersifat permeabel dan krioprotektan ekstraseluler tidak dapat keluar masuk membran karena memiliki berat molekul besar sehingga bersifat non permeable (Ariantie et al., 2013). Contoh krioprotektan intraseluler seperti gliserol ($C_3H_5(OH)_3$), dimethylsulfoxide (DMSO) ($(CH_3)_2SO$), Etilen glikol (EG) ($C_2H_6O_2$), dan 2 propanediol ($C_3H_8O_2$). Sedangkan contoh krioprotektan ekstraseluler seperti fruktosa ($C_6H_{12}O_6$), sukrosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), maltosa, protein, lipoprotein, kuning telur, serum darah dan susu (Herdis and Darmawan., 2013).

B. Faktor yang Mempengaruhi Kriopreservasi Sperma

Proses kriopreservasi (Kriopreservasi) akan membuat semen di bekukan pada suhu yang sangat rendah ($-196^{\circ}C$) membentuk kristal – kristal es, terjadi perubahan konsentrasi elektrolit intraseluler yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada sel spermatozoa. Pemilihan jenis pengencer yang tepat akan mengurangi kerusakan akibat proses kriopreservasi (Surachman et al., 2006). Hal inilah yang mengharuskan komposisi pengencer yang digunakan harus bisa melindungi sperma sesuai dengan penjelasan Pamungkas and Krisnan (2017) bahwa komposisi bahan pengencer harus mempertahankan sperma dari kejutan

dingin, motilitas, kemampuan fertilitas, menjaga kestabilan membrane plasma maupun menjamin ketersediaan substrat energi untuk spermatozoa. Lebih lanjut di jelaskan oleh (Futino et al., 2010) bahwa fungsi pengencer yaitu untuk mengurangi efek negative perubahan pH dan osmolaritas, mencegah pertumbuhan bakteri, dan melindungi sel-sel spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh proses pendinginan, kriopreservasi, serta pencairan kembali.

Baust et al., (2009) telah merangkum faktor-faktor yang mempengaruhi sel sperma selama tahap pendinginan dan kriopreservasi diantaranya : 1) selama pendinginan, sel sperma banyak teradapat efek berbahaya seperti gangguan metabolisme, ketidakseimbangan ionic, aktivasi protease, asidosis seluler, kekurangan energi, transisi fase membrane, destabilisasi sitoskeleton, dan produksi radikal bebas atau spesies oksigen reaktif (ROS), 2) selama proses kriopreservasi, spermatozoa cenderung mengalami efek merugikan berupa pembentukan kristal es, hiperosmolaritas, perubahan volume sel, dan denaturasi protein.

Watson (2000) menyebutkan sejumlah faktor yang mempengaruhi keberhasilan teknik kriopreservasi diantaranya

- 1) Kecepatan kriopreservasi, dimana jika kriopreservasi terlalu lambat maka air akan banyak keluar dari sel dan akan terjadi dehidrasi. Sedangkan jika terlalu cepat maka akan terbentuk kristal es yang halus didalam sel dan cenderung membentuk kristal es yang besar serta mengakibatkan kerusakan bahkan kematian sel (Parks and Graham., 1992);
- 2) Jenis dan konsentrasi krioprotektan, krioprotektan merupakan zat kimia non elektrolit yang berperan untuk mengurangi dan mematikan selama kriopreservasi berupa larutan kristal es untuk mempertahankan viabilitas sel. Berdasarkan sifat-sifat fisikokimia dan daya permeabilitas membran, krioprotektan dibagi menjadi dua kelompok, yaitu (1) krioprotektan

intraseluler, merupakan membran yang dapat keluar masuk dan memiliki bobot molekul lebih kecil sehingga bersifat permeable (contoh: gliserol, etilen glikol, propanadiol), dan (2) krioprotektan ekstraseluler, merupakan sel yang tidak dapat keluar masuk membran karena memiliki bobot molekul lebih besar sehingga bersifat non permeatif (contoh: protein, sukrosa, manosa, rafinosa, kuning telur, susu) (Supriatna and Pasaribu., 1992)

C. Tinjauan Umum Pengencer

Pengencer semen merupakan bahan-bahan yang digunakan untuk mempertahankan dan melindungi spermatozoa selama penyimpanan agar dapat digunakan dalam proses IB. Pengencer yang digunakan harus memiliki syarat-syarat tertentu untuk menjamin proses metabolisme dan respirasi spermatozoa tetap berlangsung dengan baik. Komponen yang harus dimiliki oleh pengencer adalah berupa larutan dengan isotonic (280-310 mOsm/kg), kemampuan sebagai buffer (untuk mengatur pH), melindungi dari *cold shock*, sebagai sumber energi, mampu mengontrol kontaminasi mikroba, memberikan perlindungan selama kriopreservasi dan thawing serta mempertahankan kesuburan spermatozoa (Raheja et al., 2018).

Bahan pengencer adalah campuran dari berbagai macam bahan yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa pada semen hewan. Syarat yang harus ada di dalam pengencer adalah bahan tidak bersifat toksik, isotonis, mengandung unsur yang memiliki sifat fisik dan kimiawinya hamper sama dengan semen segar, bisa mempertahankan fertilitas spermatozoa, mengandung buffer dan sebagai sumber energi, serta menghambat pertumbuhan bakteri (Susilawati., 2014). Bahan-bahan yang umum digunakan sebagai pengencer terdiri atas bahan kimia seperti larutan NaCl, KCl, Tris, asam sitrat, laktosa, fruktosa, antibiotik, susu skim dan bahan-bahan pengencer alami seperti air

kelapa, sari wortel, sari buah tomat, kuning telur, madu, filtrat jambu biji dan lain sebagainya (Malik dkk., 2017; A. Marawali dkk., 2019; Sumadiasa dkk., 2015; Yendraliza dkk., 2019).

Pengencer dengan Tris aminometan merupakan pengencer yang sangat umum digunakan untuk pengenceran sapi Bali, baik untuk semen cair maupun semen beku. Tris aminomethane merupakan *buffer* karena memiliki kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan tingkat toksisitas yang rendah meskipun dalam konsentrasi yang tinggi. Pengencer berbahan dasar Tris diketahui kemampuannya dalam memelihara daya hidup spermatozoa sapi (Van Wagtendonk-De Leeuw et al., 2000). Bahan lain yang perlu ditambahkan pada pengencer ini adalah bahan anti *cold shock*. Kuning telur atau kacang kedelai merupakan bahan anti *cold shock* yang umum ditambahkan pada pengencer semen (Aboagla and Terada., 2004)

D. Tinjauan Umum Kedelai

Tanaman kedelai (*Glycine max L. merrill*) merupakan salah satu tanaman yang tergolong dalam famili leguminosa (kacang – kacang). Tanaman kedelai berbentuk semak pendek setinggi 30 – 100 cm. Tanaman kedelai memiliki buah berbentuk polong dan bijinya berbentuk lonjong (Suprapti., 2003) .Tanaman kedelai adalah tanaman semusim yang penanamannya biasa pada musim kemarau karena tidak memerlukan banyak air. Sistematika tanaman kedelai menurut (Acquaah., 2008) adalah sebagai berikut :

Kerajaan : *Plantae*
 Divisi : *Magnoliphyta*
 Kelas : *Magnoliopsida*
 Subkelas : *Rosidae*
 Ordo : *Fabales*

Famili : *Fabaceae*
Genus : *Glycine*
Spesies : *Glycine max (L) Merrill.*

Kedelai atau nama latinnya (*Glycine max L. Merrill*) adalah salah satu komoditas tanaman pangan nabati yang banyak diminati oleh masyarakat. Alasan kenapa kedelai diminati yaitu karena di dalam biji kedelai terdapat zat gizi yang tinggi terutama protein dengan kualitas yang mendekati daging hewan. Di antara semua kacang-kacangan, kadar protein dari kedelai adalah yang paling tinggi (Rukmana dan Yuniarsih., 1996). Tanaman kedelai dianggap sebagai sumber utama minyak oleh masyarakat global, hal ini karena nilai gizi dan kepentingan komersialnya (Singh et al., 2019). Budidaya kedelai telah dimulai di Asia tepat 5000 tahun yang lalu, pertama di Cina dan kemudian diikuti oleh Jepang. Kemudian dibawa ke Eropa pada abad ke-18 dan selanjutnya ke Amerika Serikat pada abad ke-19 (Valliyodan et al., 2016). Karena kedelai adalah sumber minyak nabati dan protein yang sangat baik, sehingga telah menjadi tanaman yang penting secara ekonomi di seluruh dunia (Almazmomi & Alharbi., 2019).

E. Kedelai Sebagai Pengencer

Pengencer yang bukan berasal dari produk hewani yaitu yang berasal dari produk nabati salah satunya adalah kedelai. Bahan yang berasal dari tanaman dapat terformulasikan dengan baik dan bebas pathogen. Kedelai mengandung *Low Density Lipoprotein* (LDL) dalam jumlah besar yang disebut lesitin kedelai, disebut mirip dengan lesitin kuning telur, dan juga mengandung asam-asam lemak seperti asam stearate, oleat, dan palmitat yang memiliki potensi untuk melindungi membran plasma selama kriopreservasi (Chaudhari et al., 2015).

Kedelai merupakan salah satu bahan yang di manfaatkan sebagai pengencer dan memiliki kandungan nutrisi diantaranya seperti protein, mineral, lemak dan karbohidrat dimana komponen itu juga yang dibutuhkan oleh spermatozoa, selain itu mempunyai kandungan lipoprotein dan lesitin yang dapat melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Rezki et al., 2016). Dalam beberapa penelitian menyebutkan bahwa kandungan lesitin yang ada pada kedelai dapat menjadi alternatif untuk pengencer menggantikan kuning telur, karena dapat mengurangi kontaminasi bakteri dan memiliki hasil yang sama atau bahkan lebih unggul dari kuning telur (Kmenta et al., 2011; Zhao et al., 2021).

Kedelai mengandung setidaknya 1,49% sampai 3,08% lesitin, lebih tinggi dibanding dengan kacang biasa yang hanya mengandung 1,11%. Lesitin sendiri merupakan pelindung membran bagi spermatozoa yang mengandung phospholipid, lesitin dapat ditemukan di semua sel bersama dengan cephalin membentuk phospholipid bilayer. Tanpa lesitin dan fosfolipid lainnya, sel tidak akan bisa menjaga strukturnya dan bisa hancur/larut karena pengaruh lingkungannya (Rezki et al., 2016).

Senyawa yang terkandung dalam kedelai yaitu lesitin ($C_{42}H_{80}NO_8P$), dapat menggantikan peran lesitin di dalam kuning telur yang efektif yang berasal dari non-hewani. Berdasarkan asalnya lesitin kedelai merupakan campuran alami dari *phosphatidyl choline* dan beberapa asam lemak seperti stearate, oleat, dan palmitat yang dapat memberikan stabilitas structural pada membrane sel sperma (Oke et al., 2010). Lesitin kedelai memiliki massa molar 758.1 g/mol, titik leleh 236-237°C dan densitas 1.0305 g/cm³, pH 6.6.

Pengencer yang berasal dari nabati dapat menjadi alternatif untuk substitusi pengencer yang berasal dari hewani dan lebih menjanjikan. Lesitin dari kedelai telah diteliti sebagai pengencer dan ketahanannya pada beberapa hewan ternak seperti kuda (Aurich et al., 2007), sapi jantan (El-Sisy et al., 2016; Rezki et

al., 2016), anjing (Beccaglia et al., 2009; Kmenta et al., 2011; Nguyen et al., 2019), domba (Immelda et al., 2019; Zhao et al., 2021), dan kambing (Yodmingkwan et al., 2016; Fadhil et al., 2021).

F. Penggunaan Lesitin Kedelai untuk Kriopreservasi

Hasil penelitian (El-Sisy et al., 2016) penambahan lesitin kedelai dalam pengencer tris dengan konsentrasi berbeda (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 dan 4.0) setelah thawing pada semen sapi, dihasilkan kualitas semen yang diantaranya ada motilitas tertinggi pada 1% yaitu $56,00 \pm 1,00\%$, viabilitas tertinggi pada 2% yaitu $78,60 \pm 0,55\%$, abnormalitas terendah pada 1% yaitu $19,00 \pm 0,29\%$, dan membran integritas tertinggi pada 1% yaitu $72,20 \pm 1,76\%$. Disimpulkan bahwa penambahan lesitin kedelai 1% sampai dengan 1,5% dapat menggantikan penggunaan kuning telur sebagai krioprotektan dalam pengencer.

Hasil penelitian Xin Yi and Kusumawati (2018) menggunakan konsentrasi lesitin kedelai yang berbeda (1%, 1,5% dan 2%), persentase viabilitas yang tertinggi pada konsentrasi 2% dengan rata-rata $71,4 \pm 4,5\%$ dibandingkan dengan lesitin kuning telur yaitu hanya $65,54 \pm 5,82\%$. Pada penelitian yang dilakukan oleh Veerasingam dan Kusumawati (2018) penambahan lesitin kedelai dengan konsentrasi berbeda menghasilkan nilai motilitas tertinggi pada konsentrasi 2% yaitu $73,6 \pm 2,1\%$ dibandingkan dengan kontrol pada lesitin kuning telur yaitu $69,0 \pm 2,27\%$. Pada kedua penelitian ini disimpulkan konsentrasi lesitin kedelai terbaik yaitu 2% karena dapat mempertahankan kualitas semen sapi Ongole setelah thawing.

G. Kerangka Pikir

Pengembangan dan peningkatan kualitas pejantan unggul untuk pembibitan telah dilakukan dengan salah satu cara yaitu melakukan inseminasi buatan (IB). Keberhasilan IB dapat ditentukan oleh kualitas semen yang

digunakan, semen yang digunakan untuk proses IB perlu di encerkan terlebih dahulu. Semen punya sifat sukar mempertahankan hidup lebih dari 24 jam tanpa tambahan nutrisi yang berasal dari bahan pengencer karena sangat berperan penting dalam melindungi spermatozoa. Salah satu tahapan penting dalam IB adalah pengawetan, baik dalam tujuan penyimpanan jangka pendek (preservasi) maupun penyimpanan jangka panjang / kriopreservasi (kriopreservasi).

Proses kriopreservasi dan pencairan kembali (*thawing*) dapat mengakibatkan perubahan biologis dan fungsional pada spermatozoa. Faktor utama yang dapat menurunkan kualitas spermatozoa selama proses kriopreservasi yaitu adanya kejutan dingin (*cold shock*), perubahan intraselular akibat pengeluaran air yang berkaitan dengan pembentukan kristal es, peroksida lipid, dan faktor antibeku pada plasma semen. Hal yang sama disebutkan oleh (Paulenz et al., 2005) yaitu beberapa kerusakan yang terjadi pada spermatozoa selama proses kriopreservasi diantaranya yaitu 1) kerusakan mekanis yang ditandai oleh kerusakan organel sitoplasma, 2) konsentrasi larutan menjadi toksik akibat dehidrasi dari suspensi media baik intra maupun ekstraseluler, serta 3) perubahan fisik maupun antaranya presipitasi, denaturasi, koagulasi protein, disosiasi ion bahkan kehilangan sifat-sifat absorpsi atau pengikat air.

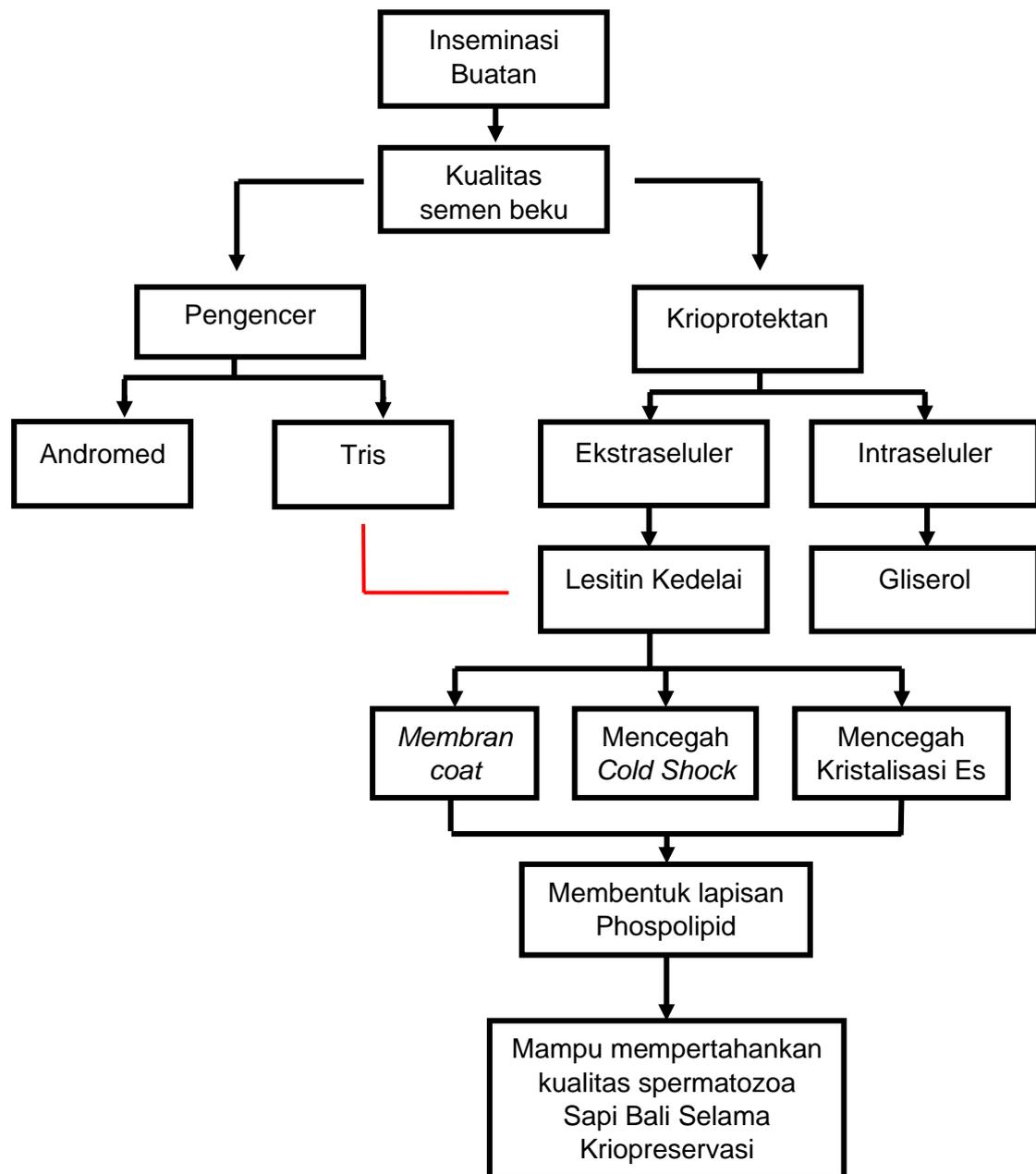
Media yang dapat membantu kriopreservasi yaitu pengencer, karena fungsinya sebagai pelindung sperma saat di bekukan sampai di cairkan kembali. Komposisi bahan pengencer yang digunakan untuk kriopreservasi semen harus mampu melindungi spermatozoa dari kejutan dingin, mempertahankan motilitas dan kemampuan fertilitas spermatozoa, serta menjaga kestabilan membran plasma dan ketersediaan substrat energi untuk spermatozoa. Salah satu komponen bahan pengencer yang umum digunakan adalah kuning telur. Kandungan lesitin kuning telur yang bersifat sebagai membran *coating* dan dapat

mempertahankan dan melindungi membran spermatozoa pada saat pendinginan dan kriopreservasi.

Pengencer komersial seperti Andromed yang berupa cairan yang mengandung lesitin sebesar 6.76 g/100 ml yang berasal dari ekstrak kacang kedelai. Pengencer ini mengandung protein, karbohidrat, mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, dan fosfor), asam sitrat, gliserol, lemak dan *glyceryl phosphoryl choline* (GPC) (Ervandi et al., 2013).

Pengencer buatan yang berasal dari kuning telur dan susu skim yang umum digunakan selama ini untuk pengenceran semen kurang di rekomendasikan karena memungkinkan kontaminasi oleh mikroba serta dalam beberapa penelitian sebelumnya disebutkan bahwa kuning telur sebagai pengencer dapat menurunkan viabilitas dan integritas akrosom pada spermatozoa di beberapa spesies termasuk domba. Untuk mengatasi hal ini maka hal yang dapat dilakukan yaitu mengganti bahan pengencer yang sebelumnya berasal dari hewani menjadi bahan yang berasal dari nabati yaitu lesitin kedelai dari kacang kedelai.

Kedelai telah lama diteliti dan memiliki potensi untuk menggantikan kuning telur sebagai pengencer. Kedelai memiliki kecenderungan untuk terkontaminasi oleh bakteri lebih kecil dari kuning telur, mampu menekan stress oksidatif, dan mengandung bahan yang mirip dengan lesitin yang ada pada kuning telur. Mekanisme kerja lesitin dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu, lesitin pada pengencer akan berikatan dengan membran (White., 1993).



Gambar 1. Kerangka Pikir Penelitian