

TESIS

**STUDI KONSENTRASI HIDROGEN PEROKSIDA TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI BERTANDUK
DAN TIDAK BERTANDUK**

*STUDY OF CONCENTRATION HYDROGEN PEROXIDE
QUALITY OF FROZEN SEMEN HORNED
AND POLLED BALI BULLS*

**HILYA MIFTAHUL USWA
I012202017**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

TESIS

**STUDI KONSENTRASI HIDROGEN PEROKSIDA TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI BERTANDUK
DAN TIDAK BERTANDUK**

*STUDY OF CONCENTRATION HYDROGEN PEROXIDE
QUALITY OF FROZEN SEMEN HORNED
AND POLLED BALI BULLS*

**HILYA MIFTAHUL USWA
I012202017**



**PROGRAM STUDI ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

**STUDI KONSENTRASI HIDROGEN PEROKSIDA TERHADAP
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI BERTANDUK
DAN TIDAK BERTANDUK**

Disusun dan Diajukan oleh

HILYA MIFTAHUL USWA

I012202017

Kepada

**PROGRAM STUDI ILMU DAN TEKNOLOGI PETERNAKAN
FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2022**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS**STUDI KONSENTRASI HIDROGEN PEROKSIDA TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI BERTANDUK DAN TIDAK BERTANDUK**

Disusun dan diajukan oleh:

HILYA MIFTAHUL USWA
NIM: 102202017

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 28 November 2022

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping



Dr. Hasbi, S.Pt., M.Si.
NIP. 197710022005011001



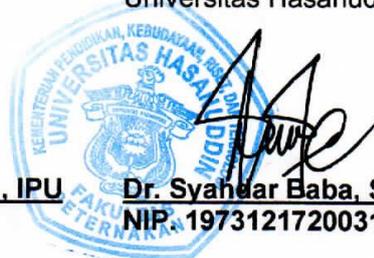
Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES., DEA.
NIP. 195701291980031001

Ketua Program Studi
Ilmu dan Teknologi Peternakan

Dekan Fakultas Peternakan
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Ir. Ambo Ako, M. Sc., IPU
NIP. 196412311989031026



Dr. Syahar Baba, S.Pt., M.Si.
NIP. 197312172003121001

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Hilya Miftahul Uswa
Nomor Mahasiswa : I012202017
Program Studi : Ilmu dan Teknologi Peternakan
Jenjang : S2

Menyatakan dengan bahwa karya tulis saya berjudul:

Studi Konsentrasi Hidrogen Peroksida Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali Bertanduk dan Tidak Bertanduk

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain, serta tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya 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, 1 Desember 2022

Yang menyatakan

A 10,000 Indonesian Rupiah banknote is shown with a signature over it. The banknote features the Garuda Pancasila emblem and the text 'SEPULUH RIBU RUPIAH', '10000', and 'REPUBLIC OF INDONESIA'. The serial number 'C77AKX146311944' is visible at the bottom.

Hilya Miftahul Uswa

PRAKATA



Alhamdulillah Robbil Alamin, puji dan syukur kepada Allah SWT yang maha pengasih lagi maha panyayang, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis dengan judul “**Studi Konsentrasi Hidrogen Peroksida Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali Bertanduk dan Tidak Bertanduk**” penulis dengan rendah hati mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan membimbing dalam menyelesaikan penelitian dan tulisan tesis ini.

Terima kasih kepada **Prof. Dr. Ir. Ambo Ako, M.Sc.** selaku ketua program studi S2 Ilmu dan Teknologi Peternakan. Terima kasih tak terhingga pada pembimbing penulis, Bapak **Hasbi, S.Pt., M.Si.** dan **Prof. Dr. Ir. Herry Sonjaya, DES., DEA.** atas waktu, bimbingan, motivasi, arahan, semangat dan segala bantuannya.

Terima kasih kepada dosen penguji **Prof. Dr. Ir. Rr. Sri Rachma Aprilita Bugiwati, M.Sc., Dr. Muhammad Hatta, S.Pt., M.Si.** dan **Dr. Ir. Zulharnaim, S.Pt., M.Si., IPM.** atas waktu, kritikan, saran dan arahan kepada penulis yang sangat bermanfaat. Terima kasih pula pada dewan Dekan, Bapak/ Ibu Dosen, dan para staff Fakultas Peternakan UNHAS.

Terima kasih kepada Ibu, saudari, dan saudara saya, atas doa, dukungan dan kasih sayang pada penulis. Terima kasih juga pada **Ibu Dr. Sri Gustina, S.Pt., M.Si.** yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran untuk membimbing penulis selama penelitian dan penyusunan tesis. Terima kasih kepada ka Erni yang banyak membantun penulis dalam proses penelitian dan penyusunan tesis. Terima kasih kepada Rekan dan teman teman sejawat ka Hikma, Farah, Kirana, Mutmainna, Ka Adiatma dan seluruh mahasiswa S2 Ilmu dan Teknologi peternakan angkatan 2020-2.

Terima kasih kepada keluarga Besar Morula IVF Makassar para dokter, para staff atas dukungan dan pengertiannya. Kepada Tim kerja penulis Reski Adelia, S.Pd., M.Si., dan drh. Fitri Hardiani F, Terima kasih banyak atas pengertian, dukungan, masukkan dan bimbinganya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan Tesis. Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam Tesis ini, sehingga saran, masukan, dan kritik yang membangun akan sangat membantu kemajuan ilmu pengetahuan bagi penulis dan semoga tesis ini bermanfaat.

Makassar, Desember 2022

Penulis

HILYA MIFTAHUL USWA. STUDI KONSENTRASI HIDROGEN PEROKSIDA TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI BERTANDUK DAN TIDAK BERTANDUK, dibimbing oleh Hasbi dan Herry Sonjaya.

ABSTRAK

Kriopreservasi spermatozoa menyebabkan pembentukan radikal bebas berupa hidrogen peroksida (H_2O_2), interaksi antara NADPH oksidase membran plasma dengan rantai transport elektron mitokondria yang dapat merusak hingga menyebabkan kematian sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi H_2O_2 yang terdapat pada semen beku apakah mempengaruhi kualitasnya. Penilaian kualitas semen meliputi, motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), dan abnormalitas. Penelitian ini menggunakan semen beku yang berasal dari 2 ekor sapi Bali bertanduk dan 2 ekor sapi Bali tidak bertanduk berumur 5-7 tahun. Konsentrasi H_2O_2 diukur menggunakan pewarna 2-7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA), motilitas dinilai secara subjektif dibawah mikroskop, viabilitas menggunakan eosin-negrosin, MPU dievaluasi menggunakan metode Hypoosmotic Swelling Test (HOS-Test) dan abnormalitas dievaluasi dengan pewarna Sperm Stein Ready to Use. Hasil Penelitian menunjukkan konsentrasi H_2O_2 semen beku sapi Bali bertanduk dan tidak bertanduk tidak berbeda (2.37 ± 0.64 vs 2.65 ± 0.94), diikuti dengan hasil dari motilitas (47.25 ± 5.03 vs 44.25 ± 8.12), MPU (50.63 ± 6.27 vs 52.75 ± 5.76), dan abnormalitas (15.90 ± 5.70 vs 19.19 ± 6.36) semen beku sapi Bali bertanduk maupun tidak bertanduk tidak berbeda nyata ($P > 0.05$). Perbedaan diperlihatkan pada viabilitas (53.71 ± 8.56 vs 64.09 ± 9.48). Penelitian ini menyimpulkan konsentrasi H_2O_2 tidak memberi pengaruh terhadap kualitas semen beku sapi Bali bertanduk dan tidak bertanduk.

Kata Kunci: Sapi Bali Bertanduk, tidak bertanduk, kualitas semen

HILYA MIFTAHUL USWA. STUDY OF CONCENTRATION HYDROGEN PEROXIDE QUALITY OF FROZEN SEMEN HORNED AND POLLED BALI BULLS, Supervised by Hasbi dan Herry Sonjaya.

ABSTRACT

Spermatozoa cryopreservation can cause the formation of free radicals in the form of hydrogen peroxide (H_2O_2). The interaction between plasma membrane NADPH oxidase and the mitochondrial electron transport chain can damage and cause cell death. This study aimed to determine the concentration of H_2O_2 in the quality of frozen semen. Assessment of semen quality includes motility, viability, intact plasma membrane (IPM), and abnormalities. This study used frozen semen from 2 horned and 2 polled Bali bulls aged 5-7 years. The concentration of H_2O_2 was measured using 2-7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) dye, motility was assessed subjectively under a microscope, viability was assessed using eosin-negrosin, IPM was evaluated using the Hypoosmotic Swelling Test (HOS-Test) method and abnormalities were evaluated with Sperm Stein Ready to Use dye. The results showed that the concentration of H_2O_2 in frozen semen of horned and polled Bali bulls was not different (2.37 ± 0.64 vs 2.65 ± 0.94), followed by the results of motility (47.25 ± 5.03 vs 44.25 ± 8.12), IPM (50.63 ± 6.27 vs 52.75 ± 5.76), and abnormalities (15.90 ± 5.70 vs 19.19 ± 6.36) were not significantly different ($P > 0.05$). Differences were shown in viability (53.71 ± 8.56 vs 64.09 ± 9.48). Thus, this study concluded that the concentration of H_2O_2 did not affect the frozen semen quality of horned and polled Bali cattle.

Key Words: Horned Bali cattle, polled bull, semen quality.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Gambaran Umum Sapi Bali	4
B. Sapi Bali Tidak Betanduk	6
C. Hidrogen Peroksida	8
D. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kualitas Semen	12
E. Kerangka Pikir.....	15

III. METODE PENELITIAN	16
A. Waktu dan Tempat Penelitian	16
B. Materi Penelitian	16
C. Rancangan Penelitian.....	16
D. Prosedur Penelitian.....	16
E. Analisa Data.....	20
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
A. Konsentrasi Hidrogen Peroksida (H_2O_2)	22
B. Motilitas.....	25
C. Viabilitas.....	26
D. Membran Plasma Utuh (MPU).....	22
E. Abnormalitas.....	25
V. PENUTUP.....	33
A. Kesimpulan.....	33
B. Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Sapi Bali bertanduk Jantan	5
Gambar 2. Sapi Bali polled Jantan dan Betina	7
Gambar 3. ROS intraseluler Sperma	10
Gambar 4. Kerangka Pikir.....	14
Gambar 5. Diagram batang kualitas semen beku sapi Bali bertanduk dan sapi Bali tidak bertanduk	20
Gambar 6. Fotomikrograf sperma	22
Gambar 7. Penentuan viabilitas sperma dengan eosin negrosin	26
Gambar 8. Penentuan nilai MPU sperma dengan metode HOS-Test	28
Gambar 9. Spermatozoa dengan morffologi abnormal	29

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sapi Bali merupakan ternak tipe potong atau pedaging dan sebagai ternak pekerja. Jenis sapi ini banyak diminati karena kemampuannya beradaptasi dengan lingkungan yang marginal dan tidak dimiliki oleh beberapa bangsa sapi lainnya, sehingga pengembangannya semakin diminati peternak dan masyarakat (Purwantara *et al.*, 2012). Kemampuan beradaptasi dengan lingkungan menjadi keunggulan yang dimiliki sapi Bali, sehingga budidayanya terus dikembangkan hingga jenis sapi Bali yang tanduknya tidak tumbuh secara normal (*Polled*) juga dikembangkan untuk memperbaiki produktivitasnya.

Sapi Bali yang tanduknya tidak tumbuh secara alami (*Polled*) pertama kali ditemukan di Sidendreg-Rappang (Sidrap) pada tahun 1980 hasil persilangan sapi Bali dengan sapi Brahman Cross (Baco dkk., 2020). Jenis sapi Bali *polled* ini dianggap memiliki keunggulan dalam proses pemeliharaan sapi, sebab cedera yang mungkin terjadi dikarenakan tanduk, tidak perlu dikhawatirkan lagi. Upaya yang dapat dilakukan untuk mengembangkan jenis sapi Bali *polled* salah satunya dengan bioteknologi reproduksi berupa inseminasi buatan (IB).

Keberhasilan IB tidak lepas dari kualitas semen beku yang digunakan, rendahnya kualitas semen beku umumnya dikarenakan kerusakan spermatozoa (Rizal dan Herdis, 2010). Spermatozoa yang melewati proses pembekuan dan *thawing* menyebabkan pembentukan kristal es dan tekanan osmotik pada sel, sehingga merusak membran plasma, penurunan motilitas, dan memicu peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Taufiqurrachman, 2012 dan Insani *et al.*, 2014).

Pembentukan ROS sebagian besar berasal dari metabolisme sel, sedangkan sebagian kecilnya berasal dari paparan radikal dari luar. ROS yang diproduksi spermatozoa berperan menjalankan fungsi kapasitas, hiperaktivasi, dan fusi spermatozoa dengan oosit. Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida yang selanjutnya diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2), hidrogen dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil (OH) yang menimbulkan peroksidasi lemak, sehingga terjadi kerusakan membran sel (Parwata, 2015).

Keberadaan H_2O_2 pada sperma akan menyebabkan pengaruh terhadap spermatozoa seperti penjelasan diatas, penelitian konsentrasi H_2O_2 pada semen ruminansia telah diteliti, yaitu oleh Gürler *et al.* (2016) mengukur konsentrasi H_2O_2 semen beku sapi Simental (23,02- 80,09), Gallo *et al.* (2018) pada semen beku sapi FH dan manusia (7,0- 27,9) dan (13,6- 96,5), dan Mislei *et al.* (2020) pada semen beku kuda (185,1-

379,2). Kosentrasi H_2O_2 sperma sapi Bali hingga saat ini belum dilakukan, hal inilah yang menjadi alasan dilakukannya penelitian ini.

B. Rumusan Masalah

Terumuskan masalah untuk mengetahui konsentrasi Hidrogen Peroksida) dan bagaimana pengaruhnya terhadap kualitas dari semen beku (motilitas, viabilitas, membran plasma utuh dan abnormalitas) sapi Bali bertanduk dan tidak bertanduk?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi Hidrogen Peroksida) semen beku sapi Bali bertanduk maupun tidak bertanduk dan bagaimanakah pengaruhnya terhadap kualitas (motilitas, viabilitas, membran plasma utuh dan abnormalitas) semen beku sapi Bali bertanduk dan tidak bertanduk.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan menjadi informasi baru terhadap kualitas semen beku sapi Bali bertanduk dan sapi Bali tidak bertanduk.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Sapi Bali

Populasi sapi Bali di Indonesia tercatat sebanyak 4.789.521 ekor atau sebesar 32% dari total populasi sapi potong sebesar 14.824.373 yang tersebar di 33 provinsi di Indonesia (Ditjennak, 2011). Sapi Bali (Gambar 1.) termasuk sapi yang banyak dternakan oleh masyarakat atau peternakan rakyat, sebab kemampuan beradaptasi dan toleransinya terhadap pakan dengan nutrisi renda. Usaha peternakan ini telah menyebar ke beberapa daerah di Indonesia seperti NTB, Bali, dan Sulawesi Selatan (Hikmawati dkk., 2014). Walau dalam penelitian Hikmawati dkk. (2014) menunjukkan ada keragaman kualitas sapi Bali dari setiap daerah yang disebabkan manajemen pemeliharaan.

Sapi Bali merupakan sapi lokal Indonesia yang mana memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan hidupnya (Aisah dkk., 2017). Populasi sapi Bali di Indonesia paling tinggi bila dibandingkan dengan jenis sapi lokal lainnya (Nugraha dkk., 2019). Sapi Bali selain mampu beradaptasi dengan lingkungan secara baik, sapi Bali juga unggul memanfaatkan pakan dengan kualitas rendah, selain itu sapi lokal ini juga dapat hidup dan memproduksi baik di lahan kritis, dan unggul dijadikan sebagai sapi potong sebab persentase karkas tinggi dengan kondisi

daging yang sedikit lemak, serta memiliki keempukan daging yang tidak kalah dengan daging sapi impor (Baco dkk., 2012).



Gambar 1. Sapi Bali bertanduk Jantan (Ditjen PKH Pertanian, 2015).

Kemampuan beradaptasi dari sapi Bali yang baik menjadi daya tariknya, selain itu sapi lokal ini juga diminati sebab memiliki kualitas reproduksi yang baik, dengan umur pubertas kisaran 540 – 660 hari, berat badan saat pubertas kisaran 165 – 185 kg dan sapi Bali telah tersebar hampir ke seluruh wilayah Negara Kesatuan Republik Indonesia (DitjenPKH Pertanian, 2015). Jenis sapi Bali jantan juga memiliki kualitas spermatozoa yang baik, bahkan setelah proses pembekuan permatozoa masih mampu memenuhi syarat sperma normal hal ini dibuktikan pada penelitian Yendraliza *et al.* (2020) yang menyatakan spermatozoa yang telah dibekukan masih memiliki nilai motilitas kisaran 66,66-60,66%, viabilitas 76,67-71,34%, dan untuk sperma abnormal pasca pembekuan hanya ditemukan kisaran 10-20%.

B. Sapi Bali Tidak Betanduk

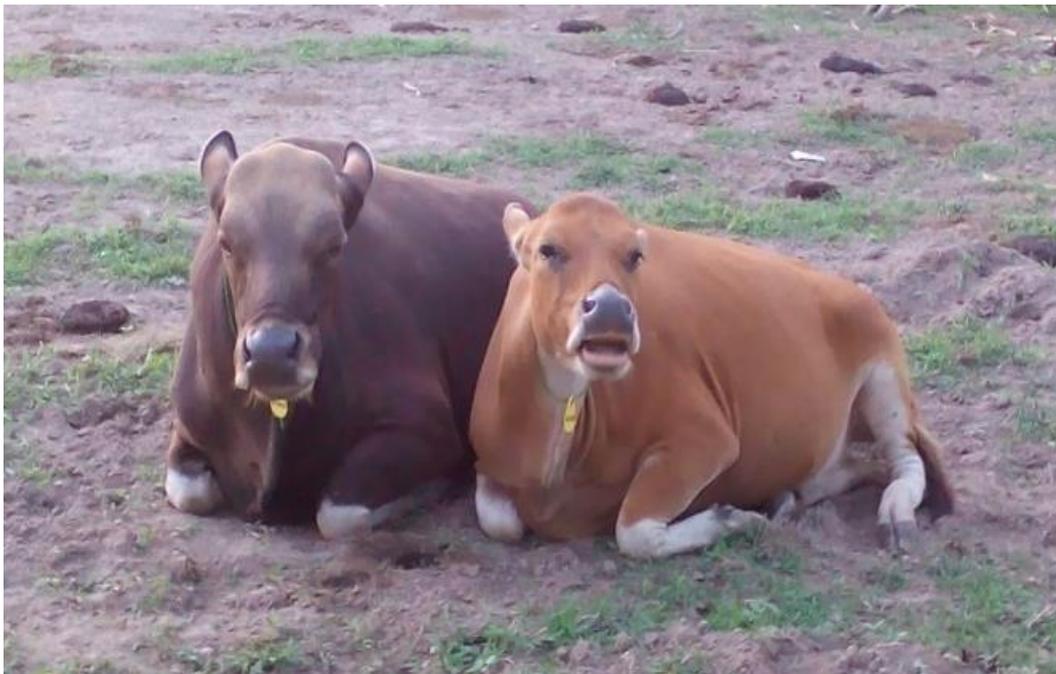
Sapi Bali yang tanduknya tidak tumbuh secara alami pertama kali ditemukan di Sidendreng-Rappang (Sidrap) pada tahun 1980, seperti pada (Gambar 2.) Sapi Bali merupakan hasil persilangan sapi Bali dengan sapi Brahman Cross (Baco dkk., 2020). Brahman Cross termasuk jenis sapi pedaging yang mampu hidup dengan baik pada daerah panas. Sapi Brahman Cross juga hasil persilangan *Bos indicus* dengan sapi Eropa kelompok *BosTaurus* (Muslim dk., 2013). Jenis Polled sapi Brahman Cross memiliki penanda lokus sentromer BTA1 POLLED (Brenneman *et al.*, 1996)

Pengembangan sapi potong di dunia saat ini mengarah pada pengembangan sapi-sapi tanpa tanduk (*polled*), disebabkan beberapa keunggulan terutama pada keunggulan dibidang manajemen pemeliharaan. Peternakan sapi potong dan sapi perah di dunia sebagian besar telah melakukan model pemeliharaan di padang penggembalaan, sehingga keberadaan tanduk dianggap mempunyai nilai yang relatif kecil, bahkan cenderung memberikan dampak kerugian ekonomi yang cukup besar karena resiko yang lebih tinggi dari cedera yang terjadi (infeksi, kerusakan karkas, dan lain-lain) (Medugorac *et al.*, 2012).

Permintaan pasar di luar negeri kini banyak yang menginginkan sapi dengan kondisi tanduk yang tidak tajam. Tetapi proses pemotongan tanduk pada sapi memerlukan keahlian khusus, dan bisa membuat ternak

tidak nyaman, sehingga saat ini terus dikembangkan jenis sapi potong yang tidak memiliki tanduk (Winding dkk., 2015).

Sapi *polled* merupakan jenis sapi yang dalam pertumbuhan tulang pada tanduk tidak terjadi secara normal. Hal tersebut menjadi keunggulan pada sapi jenis *polled*, sebab dalam pemeliharaan sapi, tentu saja pertumbuhan tanduk dapat memberikan masalah secara tidak langsung, baik saat pengangkutan sapi ke rumah potong hewan (RPH), maupun saat sapi berada dikandang (Baco dkk., 2012).



Gambar 2. Sapi Bali polled Jantan dan Betina (Zulkharnaim, 2017).

Lauwerier (2015) berpendapat sifat *polled* terjadi disebabkan oleh mutasi yang ditentukan oleh sebuah gen tunggal (gen *polled*). Lebih lanjut, sifat *polled* dikodekan dengan alel *polled* (P), bertanduk (p). Sifat *polled* bersifat dominan terhadap sifat bertanduk. Sapi-sapi tanpa tanduk selalu

dalam bentuk homozigot dominan (PP) atau heterozigot (Pp). Sifat bertanduk hanya akan muncul jika dalam bentuk homozigot resesif (pp), sehingga untuk menghasilkan sapi *polled*, hanya membutuhkan satu pejantan atau induk untuk menghasilkan keturunan *polled*.

Pengembangan sapi lokal di Indonesia dengan jenis *polled* saat ini juga telah dikembangkan, salah satu jenisnya sapi Bali *Polled* yang mana pada jenis sapi Bali ini, pertumbuhan tulang tanduknya tidak terjadi secara normal, selain terdapat perbedaan pada tanduknya, sapi Bali *polled* juga, termasuk jenis ternak yang tenang, saat proses kopulasi pada pejantan sapi Bali *polled* memiliki tingkat libido yang lebih rendah dibandingkan sapi Bali bertanduk (Hasbi dkk., 2021).

C. Hidrogen Peroksida

Hidrogen peroksida merupakan bagian dari *reactive oxygen species* (ROS), yang sebagian besar merupakan hasil dari metabolisme sel dan hasil paparan dari luar. Pembentukan hidrogen peroksida yang berlebihan akan menyebabkan sel mengalami stres oksidatif, yang akan memicu terjadinya kerusakan jaringan sel (Parwata, 2015).

Sapi merupakan organisme aerobik yang dalam 24 jam melakukan proses pernafasan dengan menghirup oksigen untuk menjalankan metabolisme basal. Konsekuensi dari proses metabolisme tersebut, sistem biokimiawi dalam tubuh menghasilkan ROS sebanyak 1 -3% dari total kebutuhan oksigen. Ketika produksi ROS masih dalam batas fisiologis dimanfaatkan pada proses kapasitas, hiperaktivasi, reaksi

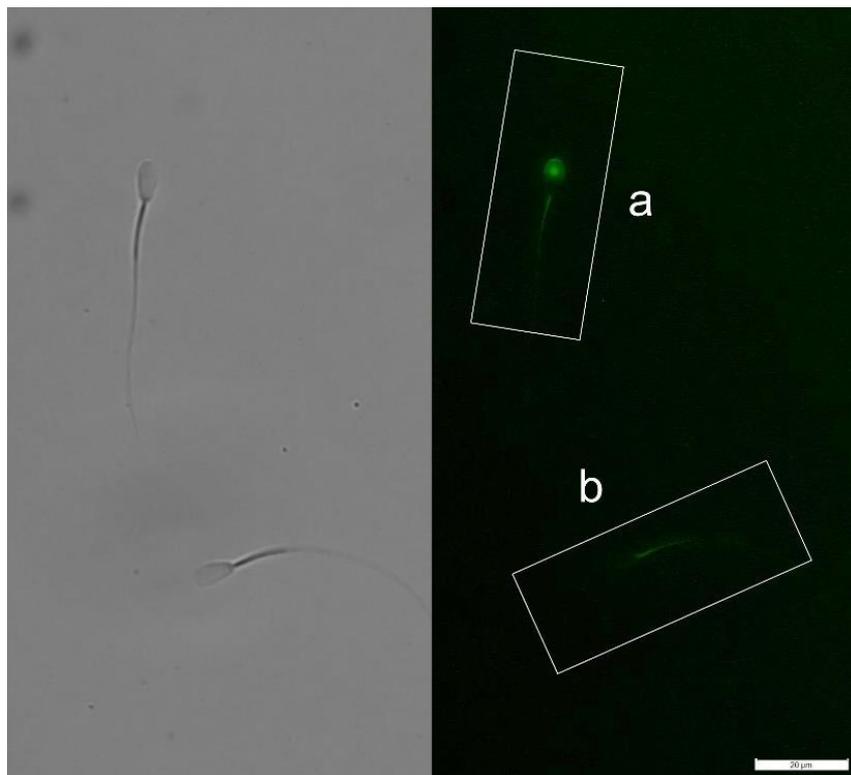
akrosom dan fertilisasi. Secara sederhana ROS merupakan radikal bebas yang mempunyai electron tidak berpasangan, bersifat sangat reaktif. ROS sendiri terdiri dari oksigen superoksida (O_2), radikal hidroksi (OH), radikal peroksil (ROO), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Taufiqurrachman, 2012).

Spermatozoa memiliki kandungan asam lemak tak jenuh pada membran plasmanya, yang mana saat konsentrasi ROS berlebihan menyebabkan peroksidasi lipid, gangguan metabolisme, reaktivitas akrosom, penurunan motilitas dan kerusakan oksidatif DNA sperma. Peroksidasi membran spermatozoa yang diinduksi oleh ROS menyebabkan penurunan motilitas baik berupa penurunan pergerakan ekor sperma dan fleksibilitas (Fang *et al.*, 2013).

Guamares *et al.* (2014) menduga bahwa ROS bertanggung jawab terhadap peroksidasi lemak pada membran plasma sperma, dimana akan terjadi perubahan permeabilitas, ketidak aktifan enzim, dan bahkan kematian sel. Spermatozoa juga akan sensitive terhadap oksidatif ketika berada dalam kondisi aerobik, disebabkan kandungan asam lemak tak jenuh dan enzim antioksidan dalam kondisi rendah.

Penelitian yang dilakukan Minervini *et al.* (2010) terhadap tingkat toxic ROS pada spermatozoa dari semen segar dan semen beku, hasil menunjukkan produksi ROS lebih banyak ditemukan pada semen beku dibandingkan semen segar, hal ini diduga karena pada spermatozoa yang berasal dari semen segar masih memiliki seminal plasma yang mengandung antioksidan untuk melindungi spermatozoa.

Upaya untuk mendeteksi kerusakan mitokondria spermatozoa yang disebabkan ROS menurut Kiani-Esfahani *et al.* (2012) dan Prihantoko *et al.* (2022) metode *flowcytometry* secara intraseluler, menggunakan 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA) dinilai mampu mendeteksi kandungan hidrogen peroksida dan aktivitas ROS pada sel spermatozoa, sebab sifat dari DCFH-DA akan masuk secara pasif ke dalam sel oleh aksi esterase seluler, saat terdapat zat oxidative (hidrogen peroksida) maka DCFH akan dioksidasi menjadi dichlorofluorescein (DCF) dan akan mempendarkan fluoresensi (warna) hijau pada sampel spermatozoa, seperti Gambar 3.



Gambar 3. ROS intraseluler Sperma, menggunakan metode DCF-DA 2-7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, aktivitas ROS pada spermatozoa berfluoresensi hijau terang (a), spermatozoa berfluoresensi hijau kusam menunjukkan tidak adanya aktivitas ROS (b) (Prihantoko *et al.*, 2022).

Oksidatif stres berupa Hidrogen peroksida berasal dari interaksi timbal balik antara NADPH oksidase membran plasma, dengan rantai transport electron mitokondria selama proses pembekuan ataupun pencairan spermatozoa. Hal ini secara signifikan akan mengurangi kualitas spermatozoa, terbukti saat pencairan atau *thawing* membran sel mengalami destabilitas dan hilangnya motilitas hingga viabilitas (Benko *et al.*, 2022).

Dubey *et al.* (2019) H₂O₂ akan menginduksi stres oksidatif pada sel sperma yang menyebabkan disfungsi sel sperma dengan menurunkan motilitas, progresif, dan bentuk kepala yang mengalami kerusakan setelah terpapar H₂O₂. Pendugaan kerusakan yang terjadi pada kepala sperma disebabkan kondensasi material genetik sebab fragmentasi DNA.

Sperma memiliki tiga lapisan membran, yaitu plasma, mitokondria dan akrosom. setiap lapisan terdiri dari asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi, sehingga mudah mengalami stres oksidatif dalam proses pembekuan (Chelucci *et al.*, 2015). Proses penanganan sperma saat pembekuan seperti pencucian, penghilangan seminal plasma semen, dan sentrifugasi dapat merusak dan menghilangkan antioksidant yang dimiliki spermatozoa, sehingga ROS dapat meningkat (Dubey *et al.*, 2019). Sperma dapat memanfaatkan ROS saat berada pada ambang batas normal sebagai aktivasi, akan tetapi saat ROS dalam kondisi yang berlebihan, dapat membuat sperma gagal melakukan fertilisasi. Secara spesifik ROS dapat mempengaruhi integritas genom sperma, peroksidai

lipid, kehilangan kemampuan dalam fluiditas dan motilitas menurun (Dubey *et al.*, 2019).

D. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Kualitas Semen

Semen yang berkualitas dari seekor pejantan unggul dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain: berat badan, umur pejantan, sifat genetik, suhu, musim, frekuensi ejakulasi dan makanan.

1. Umur pejantan bisa menjadi penentu kualitas dari semen yang dihasilkan, pada penelitian yang dilakukan Morrell (2020), menunjukkan bahwa sapi muda memiliki motilitas sperma yang lebih baik bila dibandingkan dengan pejantan tua, akan tetapi jenis pejantan usai produktif menunjukkan motilitas dan morfologi yang paling baik.
2. Faktor genetik, kualitas semen yang dihasilkan sapi jantan ditentukan dari besar tubuh pejantan tersebut, Semakin besar testis maka tubuli seminiferi akan semakin banyak dan produksi semen meningkat sebab proses spermatozoa terjadi di dalam tubuli seminiferi (Lestari dkk., 2013). Penelitian Nugraha dkk. (2019) menambahkan bahwa bobot badan yang tinggi dapat mempengaruhi kualitas semen secara keseluruhan.
3. Faktor lingkungan dapat mempengaruhi kualitas semen, seperti yang dijelaskan Aisah dkk. (2017) bahwa secara umum kualitas semen sapi Bali lebih baik saat musim kemarau dibandingkan

musim hujan, baik berdasarkan volume, warna, motilitas individu dan konsentrasinya.

4. Ismaya (2014) dalam penelitiannya menjelaskan yang mempengaruhi kualitas semen yang terkait dengan motilitas spermatozoa yaitu suhu. Kondisi dingin akan menghambat motilitas, sedangkan suhu panas meningkatkan motilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa setelah thawing minimal 40% jika kurang dari 40% maka semen beku tersebut tidak layak diinseminasikan (Feradis, 2010). Sukmawati (2014) mitokondria peka terhadap perubahan suhu, sehingga saat pembekuan dan suhu akan berubah dapat menyebabkan mitokondria mengalami kerusakan, dan penurunan motilitas sperma akan terjadi.
5. Jumlah abnormalitas pada spermatozoa sapi Bali juga dipengaruhi oleh frekuensi penampungan semen, abnormalitas spermatozoa dari pejantan yang terlatih ditampung semennya termasuk sedikit, sedangkan pada pejantan yang belum terbiasa ditampung semennya, akan menunjukkan abnormalitas primer sperma yang tinggi (Syuhriatin, 2021).

Kualitas sperma juga dipengaruhi pada proses pembekuan, seperti yang dijelaskan Syuhriatin (2021) kematian spermatozoa sekitar 30% akan terjadi saat proses pembekuan, kerusakannya diperburuk sebab membran spermatozoa yang diselubungi oleh asam lemak tak jenuh akan

mudah mengalami peroksida lemak. Kualitas spermatozoa yang terkandung pada semen beku dapat dinilai berdasarkan:

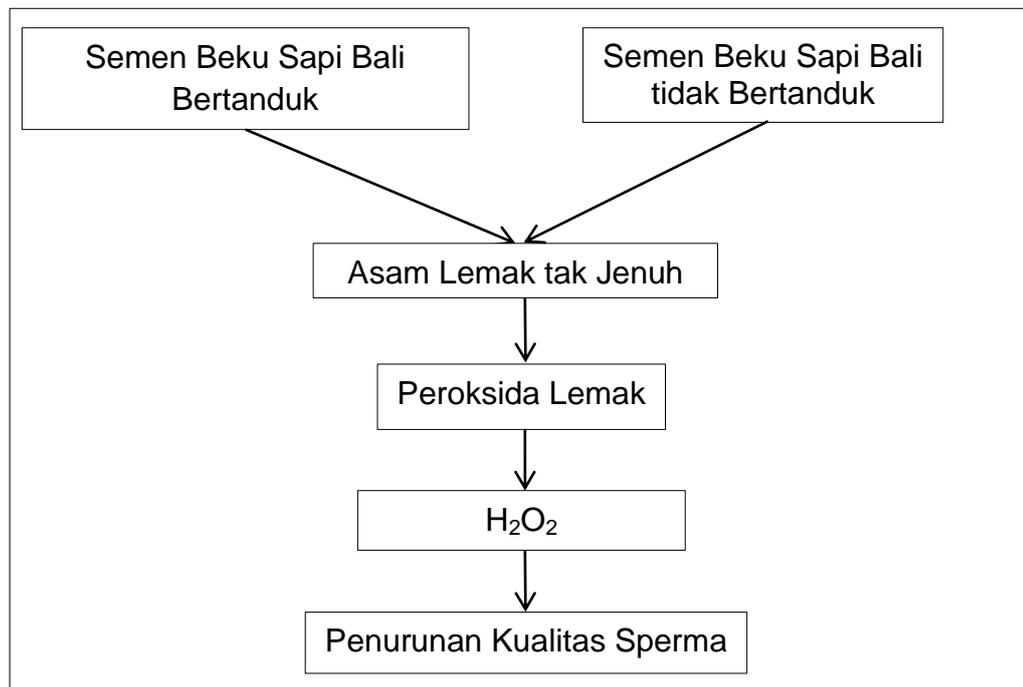
1. Motilitas spermatozoa adalah jumlah sel spermatozoa yang hidup dan bergerak maju atau progresif. Pergerakan spermatozoa bergantung pada fungsi mitokondria. Kerusakan mitokondria berkaitan dengan perubahan suhu yang dapat menurunkan kemampuan bergerak spermatozoa (Sukmawati dkk., 2014).
2. Viabilitas spermatozoa (viable sperm) adalah salah satu indikator untuk menguji spermatozoa yang hidup dengan membran yang masih utuh. Ketahanan hidup spermatozoa sangat berpengaruh terhadap keberhasilan IB ataupun proses fertilisasi di dalam organ reproduksi betina (Sukmawati dkk., 2014). Nilai viabilitas spermatozoa dari semen beku sapi Bali yang telah disimpan selama 10 tahun menunjukkan angka $55,33 \pm 2,60\%$ (Ardhani dkk., 2020).
3. Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan fisik dari spermatozoa yang terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa dalam tubuli seminiferi (abnormalitas primer), abnormalitas sekunder dapat terjadi selama spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan (Arsiwan dkk., 2014).

Penurunan kualitas yang terjadi pada proses pembekuan akan merusak sperma secara fisiologi, dimana metabolisme sperma akan rusak. Hal ini dikarenakan penurunan suhu saat pembekuan akan

mengakibatkan sperma kehilangan kemampuan bergerak dan membuat membran berada dalam kondisi kering dan rapuh. Proses pembekuan juga tidak menghindarkan degenerasi mRNA sperma terjadi (Ugur *et al.*, 2019).

E. Kerangka Pikir

Penelitian dilaksanakan berdasarkan kerangka pikir seperti yang disajikan pada Gambar 4. Proses pembekuan semen dapat menyebabkan produksi hidrogen peroksida meningkat dan membran spermatozoa yang diselubungi asam lemak tak jenuh akan mudah mengalami peroksida lemak, sehingga penurunan kualitas sperma tidak terhindarkan.



Gambar 4. Kerangka Pikir