

## 1.1 Latar Belakang

### BAB I PENDAHULUAN

Inseminasi buatan telah menjadi metode penting dalam meningkatkan kualitas dan produktivitas sapi, termasuk sapi Bali, salah satu jenis sapi lokal yang memiliki potensi besar dalam industri peternakan (Andaruisworo, 2021). Kualitas spermatozoa menjadi faktor krusial dalam keberhasilan inseminasi buatan (Sumardani & Suberata, 2023), dan oleh karena itu, pengelolaan yang efektif terhadap semen selama penyimpanan sangat penting. Salah satu aspek penting dalam proses ini adalah penggunaan pengencer semen yang bertujuan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan.

Pengenceran semen bertujuan untuk memperbanyak volume semen, melindungi spermatozoa dari *cold shock*, menyediakan zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa, menyediakan *buffer* untuk mempertahankan pH, tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, mencegah kemungkinan terjadinya pertumbuhan kuman. Bahan pengencer yang dapat digunakan untuk semen sapi adalah pengencer tris kuning telur (Setiono, 2015).

Pengencer Tris Kuning Telur (TKT) merupakan salah satu pengencer yang sering digunakan dalam inseminasi buatan karena kemampuannya dalam menyediakan nutrisi yang diperlukan untuk spermatozoa dan menjaga kondisi optimalnya (Tethool, *et al.*, 2022). Namun, meskipun Tris kuning telur sudah efektif, spermatozoa masih dapat mengalami stres oksidatif selama penyimpanan yang mengakibatkan penurunan kualitas. Stres oksidatif disebabkan oleh radikal bebas yang dapat merusak membran sel, protein, dan DNA spermatozoa, sehingga mempengaruhi viabilitas dan motilitasnya (Blegur, *et al.*, 2020). Untuk mengatasi masalah kerusakan oksidatif, penambahan senyawa antioksidan dalam pengencer semen menjadi alternatif yang menjanjikan. Ada beberapa tanaman yang mengandung anti oksidan yang tinggi seperti teh hijau (*Camellia sinensis*), Kunyit (*Curcuma longa*) yang mengandung kurkumin (Gupta, *et al.*, 2013), Daun Moringa (*Moringa oleifera*) yang mengandung vitamin C (Saini dan Keum, 2018) dan kasumba turate yang memiliki kandungan anti oksidan yang tinggi.

Kasumba Turate (*Carthamus tinctorius L.*) juga dikenal sebagai safflower memiliki kandungan senyawa yang tinggi dan aktivitas antioksidan. Tanaman Kasumba Turate ini biasanya disebut ralle oleh masyarakat Sulawesi Selatan. Kasumba Turate memiliki kandungan kimia seperti flavonoid, glikosida, sterol, polifenol, dan turunan serotonin (Hamsidi, *et al.*, 2018). Oleh karena itu, tanaman ini dapat digunakan sebagai sumber antioksidan alami, terutama pada bunganya, yang diformulasikan dalam sediaan antioksidan (Meng *et al.*, 2018).

Ekstrak bunga Kasumba Turate menunjukkan aktivitas antioksidan yang tergolong "tinggi" jika dibandingkan dengan antioksidan alami lainnya. Hal ini didukung oleh kandungan senyawa fenolik yang lebih tinggi, yakni sebesar 63% (Astuti, 2019), dibandingkan dengan kandungan fenolik pada daun kelor (*Moringa oleifera*) yang hanya mencapai 17,12% (Rudiana, 2021). Senyawa fenolik ini berperan penting sebagai agen antioksidan (Astuti, 2019). Yasir (2021) Memaparkan hasil penelitian tentang kandungan antioksidan bunga Kasumba turate yang menunjukkan bahwa bunga Kasumba turate memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Hal ini ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub> yang berada pada kisaran 89,19% , sedangkan pada daun kelor menunjukkan nilai IC<sub>50</sub> 71,27% µg/ml

(Rudiana, 2021). Senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan kuat apabila nilai  $IC_{50}$  antara 50-90%  $\mu\text{g/mL}$  (Molyneux, 2004) sehingga bunga Kasumba turate ini memiliki potensi antioksidan yang baik.

Sampai saat ini, penelitian mengenai pemanfaatan ekstrak bunga Kasumba Turate sebagai antioksidan alami pada bahan pengencer spermatozoa masih sangat terbatas. Informasi terkait efektivitas ekstrak Kasumba Turate dalam meningkatkan kualitas spermatozoa yang diencerkan, terutama pada pengencer tris kuning telur, belum banyak tersedia. Minimnya studi yang membahas tentang pengaruh penambahan ekstrak Kasumba Turate terhadap kualitas sperma pada pengencer tersebut menyebabkan kurangnya data yang dapat mendukung penggunaannya. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memahami potensi ekstrak Kasumba Turate sebagai bahan tambahan antioksidan pada pengencer spermatozoa.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Tris Kuning Telur umumnya sudah dapat digunakan sebagai pengencer spermatozoa, namun kualitas spermatozoa yang di encerkan menggunakan pengencer tris kuning telur masih tergolong rendah. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi kualitas spermatozoa yang diencerkan menggunakan pengencer tris kuning telur antara lain adalah kerusakan membran plasma spermatozoa akibat peroksidasi lipid, sehingga dibutuhkan antioksidan yang dapat mengurangi terjadinya stres oksidatif. Penambahan kasumba turate sebagai anti oksidan alami diharapkan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa yang di encerkan. Maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

1. Apakah penambahan ekstrak kasumba turate pada pengencer tris kuning telur dapat mempertahankan kualitas spermatozoa?
2. Apakah perbedaan Konsentrasi Ekstrak kasumba turate pada pengencer tris kuning telur berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali yang di encerkan?

## **1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian**

Tujuan penelitian ini secara umum adalah untuk mengetahui kualitas semen sapi Bali. Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak kasumba turate dalam pengencer tris kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali.

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan wawasan dan pengetahuan, serta menjadi informasi baru dalam upaya peningkatan produktivitas dan mutu genetik sapi Bali. Manfaat secara khusus adalah dapat menjadi sumber informasi terkait pengaruh penggunaan pengencer tris kuning telur yang ditambahkan ekstrak kasumba turate dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi Bali.

## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei sampai dengan Juli 2024. Pembuatan ekstrak bunga kasumba turate dilakukan di Laboratorium Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan semen dilakukan di Samata *Integrated Farming System* (SIFS), Kelurahan Samata, Kabupaten Gowa. Pengujian semen dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak Unit *Processing Semen* Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin, Makassar.

### 2.2 Bahan dan Alat

Materi penelitian yang digunakan adalah 2 ekor sapi Bali umur 5-6 tahun. Bahan yang digunakan yaitu tris (*hydroxymethyl*) aminomethane, asam sitrat, fruktosa, kuning telur ayam kampung, gliserol, penisilin, streptomisin, aquabidest, etil asetat, Kasumba Turate, aquadest, vaseline, nitrogen cair, kertas pH, pewarna eosin 2%, tisu, NaCl 0,9%, Aluminium foil, *straw*, Kertas saring, parafilm. Alat yang digunakan antara lain adalah vagina buatan, termos, ember, tabung skala, alat tulis (pulpen dan pensil), label, tabung reaksi, gelas ukur, spoit, *gloves latex*, *drying and sterilization oven*, Evaporator, *Computer Assisted sperm analysis* (CASA). *Photometer* SDM 6, *Hot plate*, kuvet, Mikroskop, timbangan elektrik, makro dan mikro pipet, mikropipet tip, *tally counter*, pinset, *object glass* dan *cover glass*.

### 2.2 Metode Penelitian

#### Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan uji *Repeated-Measures* ANOVA dengan 4 perlakuan 5 kali ulangan (penampungan semen). Perlakuan dalam penelitian ini adalah jenis pengencer spermatozoa yang terdiri atas:

P0 = Pengencer Tris kuning telur

P1 = Pengencer Tris kuning telur + 0,5% Ekstrak kasumba turate

P2 = Pengencer tris kuning telur + 1% Ekstrak kasumba turate

P3 = Pengencer tris kuning telur + 1,5% Ekstrak kasumba turate

Sedangkan ulangannya adalah penampungan semen sebanyak lima kali.

#### Koleksi semen

Penampungan semen dilakukan selama dua kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan. Vagina buatan diisi dengan air hangat dengan suhu sekitar 55°C (Lukusa & Kabuba, 2020). Sebelum penampungan, pelumas (Vaseline) dioleskan pada bibir vagina buatan, dan tabung penampung semen dipasang di ujung bawah. Sapi terlebih dahulu dibersihkan dengan menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan kontaminasi. Sapi jantan berada di samping sapi betina. Saat sapi jantan menaiki sapi betina, penis yang sedang ereksi diarahkan ke dalam vagina buatan. Setelah semen diperoleh, volumenya dicatat dan diproses lebih lanjut di laboratorium *processing semen* (Diansyah *et al.*, 2022).

## Evaluasi Semen

### Evaluasi makroskopis

Evaluasi makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi, dan pH. volume dievaluasi dengan melihat skala pada tabung penampungan. Warna dievaluasi dengan mengamati secara visual warna dari putih susu hingga krem. Konsistensi dievaluasi dengan memiringkan tabung penampungan, meluruskannya kembali, dan menilai kecepatan semen kembali ke dasar tabung. Penilaian didasarkan pada tiga kategori, yaitu kategori encer (semen cepat kembali ke dasar tabung), sedang (semen lambat kembali ke dasar tabung dan menyisakan sedikit di dinding tabung), dan kental (semen sangat lambat kembali ke dasar tabung dan menyisakan sedikit di dinding tabung). pH dievaluasi dengan menggunakan kertas indikator pH dengan kisaran pH 6,0 - 8,0 (Diansyah *et al.*, 2022).

### Evaluasi mikroskopis

#### Konsentrasi

Konsentrasi sperma dievaluasi dengan menggunakan *photometer* SDM 6 (Minitube, Jerman). Masukkan kuvet berisi 3 ml larutan NaCl fisiologis ke dalam alat dengan garis penanda segitiga pada kuvet menghadap ke samping. Sebaliknya, garis menghadap ke depan dan kemudian tekan angka nol. Kuvet dikeluarkan dan kemudian diganti dengan kuvet yang berisi larutan NaCl yang ditambahkan 30  $\mu$ l semen segar, lalu tekan tombol hasil. Konsentrasi spermatozoa akan diperoleh dalam jumlah per ml.

#### Motilitas

Motilitas sperma dihitung dengan cara meneteskan satu tetes semen pada kaca objek dan menutupnya dengan kaca penutup. Kemudian dianalisis menggunakan CASA Sperm (program Vision Version<sup>TM</sup> 3.7.5 Minitube, Jerman) (Surahman *et al.*, 2021).

#### Viabilitas

Viabilitas sperma dihitung dengan meneteskan satu tetes semen dan larutan eosin, lalu mencampurnya secara merata. Setelah kering, diamati dengan menggunakan mikroskop perbesaran 10 x 40 kali. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna, sedangkan spermatozoa yang hidup tetap berwarna putih (Diansyah *et al.*, 2020)

#### Membran Plasma Utuh

Membran Plasma Utuh diuji dengan menggunakan metode uji Hypoosmotic Swelling (HOS). Sebanyak 10  $\mu$ l semen dicampurkan dalam 1 ml larutan HOS, dilakukan dengan cara meneteskan campuran larutan HOS dengan semen yang telah diinkubasi pada kaca objek, ditutup dengan cover glass dan dievaluasi dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Sperma dengan ekor melingkar menandakan membran plasma yang baik, sedangkan sperma dengan ekor lurus menandakan membran plasma yang rusak (Diansyah *et al.*, 2023).

#### Tudung Akrosom Utuh

Evaluasi Tudung Akrosom Utuh dilakukan terhadap spermatozoa yang ditandai dengan ujung kepala spermatozoa yang berwarna hitam pekat ketika semen dipaparkan pada larutan NaCl fisiologis yang mengandung formalin 1%. Evaluasi dilakukan terhadap minimal 200 spermatozoa dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali (Rizal, 2006).

## **Pengenceran**

Kasumba turate diekstraksi dengan metode maserasi, ditimbang lalu direndam dalam 900 ml larutan etil asetat (Lien *et al.*, 2018). Sampel dimaserasi selama 3 x 24 jam dan diaduk secara berkala (Qolbi & Yuliani. 2018). Maserat kemudian disaring dengan kertas saring (filtrat I), dan ampasnya dimaserasi kembali dengan 450 ml larutan etil asetat selama 1 hari dan disaring kembali (filtrat II). Filtrat I dan filtrat II dikumpulkan dan diuapkan menggunakan rotary evaporation dengan kecepatan 50 rpm dan suhu 40°C untuk memisahkan ekstrak dan pelarutnya (Kandou *et al.*, 2016).

Semen diencerkan dengan pengencer TKT + ekstrak Kasumba Turate. Selanjutnya ekstrak Kasumba Turate ditambahkan ke dalam perlakuan; TKT (P0), 0,5% Kasumba Turate + TKT (P1), 1% Kasumba Turate + TKT (P2), dan 1,5% ekstrak Kasumba Turate + TKT (P3). Masing-masing pengencer ditambahkan antibiotik penisilin dan streptomisin masing-masing 1000 IU/mL dan 1 mg/mL (Ariantie *et al.*, 2021). Setelah pengenceran, dilakukan pemeriksaan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, dan tudung akrosom utuh.

## **Kriopreservasi**

Kriopreservasi semen dilakukan dengan mengikuti prosedur Diansyah *dkk.* (2023). Fealing & Sealing dilakukan dan disetarakan pada suhu 3 - 5°C selama 2 - 3 jam di dalam lemari es. Kemudian, dilakukan pra-pembekuan dengan meletakkan *straw* ± 10 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 - 15 menit. Proses selanjutnya adalah memasukkan *straw* ke dalam goblet dan mencelupkannya ke dalam nitrogen cair pada suhu -196°C, yang kemudian disimpan di dalam wadah penyimpanan.

## **Thawing**

*Straw* diambil dari wadah nitrogen cair dan dicairkan dalam penangas air selama 12 detik pada suhu 37°C. *Straw* dibersihkan dan dipotong di dekat ujung yang tersumbat kapas. Satu tetes semen diteteskan pada slide kaca, dan motilitas, viabilitas, membran plasma utuh, dan tudung akrosom utuh pasca pencairan dinilai di bawah mikroskop (Rahmat *et al.*, 2024).

## **2.4 Parameter Penelitian**

### **Motilitas**

Pengamatan dilakukan dengan mengambil semen segar sebanyak 10 µl diteteskan di atas objek glass dan ditambahkan NaCl fisiologis 40 µl kemudian ditutup dengan *cover glass*, pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop perbesaran 400×, selanjutnya dianalisis menggunakan CASA dengan program Sperm Vision Versi 3.7.5 (Diansyah, *et.al.*, 2022).

### **Viabilitas Spermatozoa**

Viabilitas spermatozoa merupakan parameter yang diamati untuk mengetahui sel-sel sperma yang hidup dan mati. Semen dicampur dengan pewarnaan eosin 2% dengan perbandingan 1:1, kemudian dibuat preparate ulas dan dikeringkan di heating table selama 10 detik. Selanjutnya dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40 × 10 pengamatan dilakukan pada sepuluh lapang pandang. Spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna eosin sehingga akan berwarna merah atau merah muda akibat permeabilitas dinding sel meninggi pada sel spermatozoa yang mati (Septiyani, 2012).

Penentuan persentase spermatozoa yang hidup digunakan rumus yang diterapkan oleh WHO (1999), yakni:

$$(\% \text{ hidup}) = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{jumlah spermatozoa yang hidup dan mati}} \times 100$$

### Membran Plasma Utuh (MPU)

Menurut Fonseca *et.al.*, (2005) bahwa keutuhan membran plasma diuji menggunakan metode *hyposmotic swelling (HOS) Test*. Semen sebanyak 10  $\mu$ l dicampur dalam 1 ml larutan HOS, lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Pengujian dilakukan dengan cara meneteskan campuran larutan HOS dengan semen yang telah diinkubasi diatas object glass, ditutup dengan cover glass dan dievaluasi menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40  $\times$  10. Spermatozoa dengan ekor yang melingkar menandakan bahwa membran plasmanya utuh, sedangkan spermatozoa yang ekornya lurus menandakan membran plasmanya rusak (Ondho, 2020). Adapun perhitungannya yaitu:

$$\text{MPU } (\%) = \frac{\text{jumlah spermatozoa Ekor Melingkar}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

### Tudung Akromosom Utuh (TAU)

TAU (Tudung Akrosom Utuh): Evaluasi dilakukan terhadap keutuhan tudung akrosom spermatozoa yang ditandai oleh ujung kepala spermatozoa yang berwarna hitam tebal, apabila semen dipaparkan di dalam larutan NaCl fisiologik yang mengandung 1% formalin (Saacke dan White, 1972). Evaluasi dilakukan pada minimal 200 spermatozoa dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Sitepu & Putra, 2017). Persentase TAU dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{TAU } (\%) = \frac{\text{spermatozoa Dengan Akromosom Berwarna}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

## 2.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pemeriksaan kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas, MPU, dan TAU) dianalisis dengan uji *Repeated-Measures* ANOVA atau uji pengulangan dengan 4 perlakuan dan 5 kali ulangan. Analisis ragam tersebut didasarkan pada model matematika rancangan yang digunakan sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \epsilon_{ijk}$$

Keterangan :

- $Y_{ijk}$  = nilai pengukuran pada subjek  $i$  pada kondisi  $j$  dan pengukuran ke-  $k$ ,  
 $\mu$  = rata-rata total (mean umum),  
 $\alpha_i$  = efek dari subjek ke- $i$  (Pengaruh Level penambahan ekstrak Kasumba Turate),  
 $\beta_j$  = efek dari kondisi atau waktu ke- $j$  (Fase),  
 $\epsilon_{ijk}$  = residual atau error yang mengukur variabilitas yang tidak dapat dijelaskan oleh model (kesalahan acak pada pengukuran).