

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi Bali dikembangkan, dimanfaatkan, dan dilestarikan sebagai sumber daya ternak asli yang memiliki ciri-ciri tertentu dan dapat berkembang dengan baik pada berbagai lingkungan di Indonesia. Sapi Bali juga memiliki performa produksi yang cukup bervariasi serta kemampuan reproduksi yang tinggi. Dengan demikian, sumber daya genetik sapi Bali merupakan salah satu aset nasional, merupakan plasma nutfah yang perlu dipelihara dan dimanfaatkan secara berkelanjutan karena memiliki keunggulan yang spesifik. Sapi Bali juga telah masuk dalam aset dunia, yang tercatat dalam daftar FAO sebagai salah satu negara penghasil sapi di dunia (Hikmawaty et al., 2014). Peran sapi Bali sangat krusial dalam pengembangan subsektor peternakan, sehingga untuk meningkatkan produktivitas sapi Bali perlu dilakukan sistem perkawinan dengan inseminasi buatan (Hoesni, 2015).

Peningkatan produktivitas ternak dapat dilakukan melalui program inseminasi buatan (IB). Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan program inseminasi buatan adalah kualitas semen yang digunakan. Inseminasi buatan dapat dilakukan dengan menggunakan semen segar maupun beku. Namun selama ini dalam praktiknya lebih dominan menggunakan semen beku, mengingat efisiensinya dalam hal penyaluran dan daya simpan yang lebih lama. Sebelum semen beku digunakan untuk inseminasi buatan, terlebih dahulu dilakukan pengecekan kualitas semen beku. Hal ini dikarenakan pada beberapa kasus proses pengolahan seperti penampungan semen, pengenceran, ekuilibrasi, dan pembekuan dapat mempengaruhi kualitas semen beku yang akan diaplikasikan pada ternak (Savitri et al., 2014).

Faktor-faktor yang mempengaruhi tingkat keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) adalah pemilihan pejantan yang tepat, kualitas dan jenis pejantan yang akan diinseminasi buatan (IB), penampungan semen, proses pengenceran, proses penyimpanan semen, proses pengangkutan semen, dan proses inseminasi. Teknologi Inseminasi Buatan (IB) diharapkan dapat memberikan nilai tambah secara ekonomi dalam pengembangan usaha peternakan (Ramon et al., 2021). Berdasarkan standar nasional Indonesia (SNI 4869-1:2017), semen sapi beku setelah dicairkan pada suhu 37 °C-38 °C selama 30 detik, harus menunjukkan spermatozoa hidup dan progresif (motilitas spermatozoa) minimal 40%, skor pergerakan spermatozoa minimal dua, dan jumlah sel spermatozoa minimal 25 juta per dosis (BSN, 2017). Nilai motilitas dapat digunakan untuk menentukan semen yang dihasilkan sehingga dapat diproses lebih lanjut untuk penyimpanan dingin atau beku (Tethool et al., 2022).

Semen beku merupakan semen yang diencerkan berdasarkan prosedur tertentu, yang memiliki keunggulan yaitu dapat disimpan dalam jangka waktu lama sehingga fertilitas semen tetap terjaga, namun memiliki kelemahan penurunan kualitas semen selama proses pembekuan karena melewati berbagai suhu ekstrim yang dapat menurunkan kualitas (Priyanto, 2015). Rendahnya kualitas semen beku umumnya disebabkan oleh kerusakan spermatozoa akibat penanganan proses pembekuan yang tidak tepat. Bagian terpenting dari proses pembekuan semen adalah pembekuan itu sendiri dan pencairan. Pada saat pembekuan, terjadi pelepasan molekul air dari dalam

sel secara besar-besaran, sehingga mengakibatkan peningkatan konsentrasi elektrolit intraseluler dan juga terbentuknya kristal-kristal es. Sementara itu, pada saat pencairan, semen mengalami stres berat akibat peningkatan suhu yang drastis. Selain itu, peningkatan aktivitas metabolisme akan meningkatkan konsentrasi radikal bebas, di sinilah radikal bebas sangat berbahaya bagi kelangsungan hidup spermatozoa (Rizal dan Herdis, 2010).

Salah satu penyebab kerusakan pada spermatozoa selama proses kriopreservasi sampai pencairan kembali adalah peroksidasi lipid, Proses peroksidasi merubah struktur spermatozoa, terutama pada bagian membran dan akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler. Hal tersebut dapat dicegah dengan menambahkan antioksidan ke dalam pengencer semen (Feradis 2009).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghilangkan, membersihkan, dan menahan pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS). Antioksidan dapat mengurangi, memadamkan, atau menekan reaksi radikal bebas. Antioksidan dapat mencegah terjadinya reaksi peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa saat proses pengolahan semen sehingga membran plasma tetap utuh (Wardhana et al., 2012).

L-Carnitine adalah turunan asam amino yang meningkatkan produksi energi dan bertindak sebagai antioksidan bagi sel sperma. Fakta bahwa *L-Carnitine* ditemukan dalam konsentrasi tinggi di epididimis, organ tempat sel sperma matang, meningkatkan motilitas, dan memanfaatkan asam lemak dan fosfolipid sebagai substrat energi, menunjukkan bahwa *L-Carnitine* memiliki peran penting dalam metabolisme energi sel sperma. Sel sperma membutuhkan energi dari mitokondria untuk motilitas spermatozoa (Balogun et al., 2022). *L-Carnitine* juga merupakan komponen seperti vitamin, memiliki karakteristik antioksidan dan juga diketahui terlibat dalam metabolisme energi sehingga menyediakan pasokan energi yang lebih baik untuk sperma (Darussalam et al. 2020). *L-Carnitine* bekerja sebagai antioksidan untuk mencegah pembentukan ROS dengan menghilangkan hidrogen peroksida. *L-Carnitine* juga meningkatkan aktivitas dan tingkat enzim antioksidan seperti SOD dan GSH- Px (Koberska dan Yermishev, 2017).

Enzim superoksida dismutase (SOD) merupakan antioksidan endogen yang bekerja dengan cara mengatur kadar ROS (Simajuntak dan Zukham, 2020). Superoksida dismutase (SOD) bertugas mengubah radikal bebas oksigen menjadi H_2O_2 yang sangat toksik dan harus segera dibuang (Kürüm et al., 2019). Superoksida reaktif merupakan radikal atau anion superoksida yang dihasilkan ketika oksigen kehilangan salah satu elektronnya, *superoxide dismutase* (SOD) bertugas mengkatalisis perubahan dari superoksida menjadi oksigen elemental dan hidrogen peroksida (Fitriani et al., 2022).

Penambahan antioksidan seperti SOD pada sperma kuda, sperma banteng, dan semen kerbau telah terbukti melindungi sperma terhadap efek berbahaya ROS dan meningkatkan motilitas sperma dan integritas membran selama penyimpanan cairan sperma atau dalam keadaan tidak beku (Perumal, 2015). Efek menguntungkan dari SOD dalam pengawetan semen adalah karena SOD merupakan antioksidan yang sangat kuat (Cocchia, 2011).

1.2 Rumusan Masalah

Kualitas semen beku sangat berpengaruh terhadap keberhasilan teknologi IB, semen yang telah dibekukan dan disimpan dalam jangka waktu yang lama akan mempengaruhi daya hidup sperma karena terjadinya perubahan suhu dan akan menyebabkan terjadinya pembentukan radikal bebas yang dapat mengganggu aktivitas sperma selama pembekuan. Penambahan antioksidan jenis *Superoxide Dismutase* (SOD) dan *L-Carnitine* pada semen sapi bali mampu mempertahankan kualitas sperma, dan dapat mengendalikan autoksidasi dengan menghambat pembentukan radikal bebas dan akan mengurangi stress oksidatif, namun penggunaan antioksidan sod saat ini masih kurang diteliti pada semen sapi.

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kualitas semen beku sapi Bali dengan pemberian antioksidan SOD dan *L-Carnitine*.

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan pengetahuan mengenai kualitas semen beku yang telah diberi antioksidan SOD dan *L-Carnitine*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Mei-Oktober tahun 2024 dan berlokasi di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Daerah Sulawesi Selatan dan dievaluasi di Laboratorium Produksi Embrio In Vitro, Gedung LPPM, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Materi Penelitian

Materi pada penelitian ini menggunakan semen pejantan sapi Bali dengan sampel sebanyak 4 ekor sapi Bali jantan umur 8-9 tahun. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, alkohol 70%, kertas pH, jerami, tisu, vaselin, akuades, andromed, mini straw 0,25 ml (minitube german), nitrogen cair, eosin-nigrosin, akridin orange (AO), HCl, etanol 96%, Hypoosmotic Swelling Test (HOST), Formasalin, NaCl 0,9%, larutan carnoy, SOD (Sigma-Aldrich, Cat no: S5395) dan *L-Carnitine* (Sigma-Aldrich, Cat no: C0158).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu goblet, *container*, *coolbox*, *cover glass*, cawan petri, tabung sentrifus 15ml, gunting, hand counter, lemari pendingin, *filling and sealing machine*, mikropipet, mikroskop trinokuler Olympus CX33 dengan kamera Olympus EP50, mikroskop fluorescence Zeiss AX10 Imager A2 dengan kamera Zeiss AxioCam HRc untuk pengamatan, microtube 2ml obyek glass, *printer straw*, pingset, rak *straw*, *ministray*, tabung sperma, timbangan analitik, tip mikropipet, vagina buatan, dan waterbath.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 kali ulangan yang dilakukan 2 tahap, tahap 1 dengan penambahan antioksidan SOD dan penambahan *L-Carnitine* dan tahap 2 menggabungkan level antioksidan SOD terbaik dengan level antioksidan *L-Carnitine* terbaik, penambahan antioksidan sebagai berikut:

A. Tahap pertama

P0: Perlakuan tanpa antioksidan (kontrol)

P1: 0,5 mM SOD + Andromed + Semen segar

P2: 1 mM SOD + Andromed + Semen segar

P3: 1,5 mM SOD + Andromed + Semen segar

P0: Perlakuan tanpa antioksidan (kontrol)

P1: 0,5 mM *L-Carnitine* + Andromed + Semen segar

P2: 1 mM *L-Carnitine* + Andromed + Semen segar

P3: 1,5 mM *L-Carnitine* + Andromed + Semen segar

B. Tahap kedua

P0: SOD level terbaik + Andromed + Semen segar

P1: *L-Carnitine* level terbaik + Andromed + Semen segar

P2: SOD level terbaik + *L-Carnitine* level terbaik + Andromed + Semen segar

2.4 Metode Penelitian

Koleksi dan Evaluasi Semen

Semen dikoleksi dengan menggunakan metode vagina buatan yang kemudian dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume, konsistensi, warna pH, dan bau, sedangkan uji mikroskopis meliputi gerakan massa motilitas dan konsentrasi (Arifiantini, 2012). Volume dievaluasi dengan cara melihat skala pada tabung penampung. Konsistensi dievaluasi dengan cara memiringkan tabung penampung kemudian menegakkannya kembali dan dinilai berdasarkan kecepatan semen kembali ke dasar tabung. Penilaian berdasarkan tiga kategori, yaitu kategori encer (semen cepat kembali ke dasar tabung), sedang (semen lambat kembali ke dasar tabung dan menyisakan sebagian di dinding tabung) dan kental (semen sangat lambat kembali ke dasar tabung dan menyisakan sebagian di dinding tabung). Warna dievaluasi dengan cara melihat secara visual yaitu warna putih susu hingga krem. pH dievaluasi dengan menggunakan pH spesial indicator paper pada kisaran pH 6.4 – 8.0 (Darussalam et al., 2020)

Pengamatan gerak massa dilakukan dengan 10µl atau setetes semen diletakkan diatas gelas objek lalu diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 10×10 . Penilaian dilakukan dengan cara melihat tebal-tipisnya gelombang massa dan kecepatan gelombang spermatozoa berpindah tempat. Kriteria penilaian yaitu +++, ++ dan +. Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan menggunakan alat photometer SDM 6 (Minitube, Germany). Kuvet yang berisi larutan NaCl fisiologis sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam alat photometer dengan posisi garis menghadap ke depan kemudian ditekan tombol zero. Kuvet dikeluarkan lalu diganti dengan kuvet yang berisi 35 µL semen segar yang sudah diencerkan dalam 3.5 mL NaCl fisiologis (1:100), kemudian ditekan tombol result, maka konsentrasi spermatozoa akan didapatkan dalam jumlah sel/ml (Darussalam et al., 2020).

Pengenceran Semen

Pada proses pengenceran semen dimulai dengan penambahan antioksidan kedalam tabung reaksi yang dibagi menjadi dua tahapan yaitu tahap pertama penambahan empat konsentrasi SOD yang berbeda (kontrol, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM) dan empat konsentrasi *L-Carnitine* yang berbeda (kontrol, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM) dan tahap kedua melibatkan pengujian tiga kelompok perlakuan, SOD 1,5 mM, *L-Carnitine* 1 mM, dan kombinasi keduanya (SOD 1,5 mM dan *L-Carnitine* 1 mM), selanjutnya menambahkan Pengencer Andromed® (Minitube Jerman) yang merupakan salah satu pengencer semen komersial yang tidak mengandung kuning telur. Pengencer semen komersial ini selain tidak terkontaminasi mikroorganisme yang berasal dari kuning telur juga mudah digunakan karena telah tersedia dalam paket siap pakai. Komposisi Andromed® sendiri terdiri dari Tris hydroxy-aminomethane sebagai 28 buffer, gula sebagai sumber energi, gliserol sebagai krioprotektan dan antibiotik untuk mencegah pertumbuhan bakteri (Juniandri et al., 2014). kemudian menambahkan semen segar yang telah memenuhi syarat untuk diproses menjadi semen beku ke masing-masing tabung. Setelah semua komposisi telah dimasukkan kedalam masing-masing tabung Selanjutnya dilakukan proses pengisian semen yang telah diencerkan (filling) ke dalam

straw sebanyak 0,25 ml/straw kemudian dilanjutkan dengan proses (sealing) atau penyegelan straw, agar isi semen tidak tumpah saat disimpan dalam kontainer.

Equilibrasi, Pra Pembekuan dan Pembekuan Semen

Semen yang telah dimasukkan kedalam mini straw kemudian di ekuilibrasi dalam lemari pendingin (4-5°C) selama 3 jam. Selanjutnya dilakukan pre freezing dengan meletakkan straw di atas uap nitrogen cair menggunakan kotak styrofoam yang sudah diisi nitrogen cair dengan batas ketinggian 7 cm, sedangkan jarak permukaan nitrogen cair dengan straw di dalam boks 4 cm selama 10 menit. Kemudian dibekukan dan disimpan kedalam kontainer dengan suhu -196°C mengacu pada penelitian Rangkuti dkk. (2021).

Evaluasi Post-Thawing

Evaluasi semen Post-Thawing menggunakan air hangat pada suhu 37°C selama 30 detik (Sukmawati et al., 2014). untuk evaluasi kualitas semen post-thawing dengan empat ulangan. Evaluasi pasca pencairan meliputi motilitas, abnormalitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), tudung akrosom utuh (TAU), dan Fragmentasi DNA (Gustina et al., 2024). Evaluasi motilitas dilakukan mengikuti prosedur yang telah dilaporkan sebelumnya oleh (Priyanto et al., 2015). Motilitas dinilai secara subjektif dengan melihat jumlah spermatozoa yang bergerak lurus ke depan (progresif) dengan penilaian 0-100% pada skala 5%. Evaluasi viabilitas dilakukan dengan menggunakan pewarna eosin- nigrosin dengan membuat preparat sekrup yang dikeringkan di udara selama 15-20 detik. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 200 kali. Sperma hidup (transparan) dan spermatozoa mati (ungu) dihitung pada 10 lapang pandang (Priyanto et al., 2015). Abnormalitas spermatozoa dievaluasi menggunakan pewarna eosin-nigrosin. Pengamatan dilakukan terhadap minimal 200 spermatozoa dengan melihat bagian kepala, leher, dan ekor spermatozoa. Terdapat lima kategori spermatozoa abnormal, yaitu tidak berekor, kepala abnormal, bentuk ekor abnormal dengan tetesan sitoplasma pada bagian proksimal, dan bentuk ekor abnormal pada bagian distal tetesan (Susilawati, 2011). Integritas membran plasma dievaluasi menggunakan metode Hypoosmotic Swelling Test (HOSTest). Evaluasi dilakukan di bawah mikroskop Olympus CX33 dengan kamera EP50 pada perbesaran 200 kali. Spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau menggembung, sedangkan membran plasma tanpa integritas ditandai dengan ekor yang lurus. Evaluasi MPU dilakukan pada 5 kali lapang pandang atau minimal 200 sel spermatozoa (Priyanto et al., 2015). Evaluasi tudung akrosom utuh dilakukan dengan menggunakan larutan formalin (formalin 1%; NaCl fisiologis 0,9%) mengikuti prosedur yang telah dilaporkan sebelumnya oleh Cahya et al. (2017). Fragmentasi DNA dievaluasi dengan mikroskop fluoresensi Zeiss Axio Imager A2 dengan Zeiss AxioCam. Kamera HRc menggunakan pewarna akridin oranye (AO) mengikuti prosedur yang dilaporkan oleh Adiputra et al. (2022). Fragmentasi DNA akan memancarkan warna oranye fluoresensi, sedangkan spermatozoa yang tidak terfragmentasi akan menghasilkan warna hijau (Handayani et al., 2021).

2.5 Parameter Penelitian

Parameter kualitas spermatozoa yang diukur yaitu secara makroskopis (volume, konsistensi warna, dan pH) dan secara mikroskopis (Gerak massa, motilitas, viabilitas, abnormalitas, MPU, TAU dan fragmentasi DNA)

2.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan analisis anova berdasarkan RAL dalam program IBM SPSS Statistical untuk Windows, versi 22 (IBM Corp., NY, USA). dilanjutkan dengan uji post hoc tukey untuk mengetahui perbedaan yang signifikan.

Rumus matematika RAL

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan: $i = 1, 2, \dots, t$ dan $j = 1, 2, \dots, r$

Y_{ij} : pengamatan pada perlakuan ke i dan ulangan ke j

μ : rata-rata umum

τ_i : pengaruh perlakuan ke i

ε_{ij} : pengaruh galat percobaan pada perlakuan ke i dan ulangan ke j

