

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Peningkatan populasi ternak potong khususnya ternak sapi Bali sejauh ini sudah banyak dilakukan dengan penerapan teknologi dibidang reproduksi ternak salah satunya adalah Inseminasi Buatan (IB) untuk mempercepat dan memperbanyak keturunan secara efisien (Ervandi dkk., 2023). IB merupakan teknologi reproduksi pertama yang telah memberikan kontribusi terhadap perbaikan genetik pada sapi. Kemampuan produksi dan potensi genetik sapi jantan dapat dinilai dari kualitas semen yang dihasilkan, sehingga harus disertai dengan teknis produksi semen yang baik karena menjadi salah satu penentu keberhasilan pelaksanaan IB. Pelaksanaan IB dilapangan sangat bergantung pada beberapa faktor, salah satunya adalah kondisi semen yang digunakan, baik semen cair maupun semen beku. Kriteria yang dibutuhkan untuk menunjang produksi semen cair dan semen beku adalah semen harus berkualitas baik dengan daya hidup tinggi dan memerlukan proses pengenceran semen yang efektif, efisien serta mudah diaplikasikan (Tethool dkk., 2022).

Karakteristik spermatozoa yang baik yaitu memiliki keutuhan selubung membran. Keutuhan membran berfungsi sebagai perlindungan organel-organel sel dalam membran yang berhubungan dengan tingkat metabolisme sel. Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses transportasi zat nutrisi sebagai pembentuk energi gerak yang berhubungan dengan progresif aktif0 spermatozoa. Keadaan ini berpengaruh terhadap daya gerak yang aktif dan progresif spermatozoa menuju fertilisasi. Patokan daya gerak yang aktif adalah standar utama sebagai nilai mendapatkan tingkat fertilisasi inseminasi buatan (IB) yang dilaksanakan (Pajri dan Jiyanto., 2019).

Tudung akrosom memiliki fungsi yang cukup penting untuk keberhasilan fertilisasi saat perkawinan. Keutuhan dari tudung akrosom sangat penting pada saat preservasi, hal ini berhubungan dengan kandungan enzim – enzim yang terkandung di dalamnya. Kerusakan tudung akrosom akan menyebabkan enzim – enzim keluar yang menyebabkan hilangnya kemampuan spermatozoa saat pembuahan. Pada proses fertilisasi selain motilitas spermatozoa, keutuhan tudung akrosom dan membran plasma sangat menentukan kemampuan membuahi oosit. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan akan mempengaruhi lipid membran terutama asam lemak poli tak jenuh sehingga terjadi peroksidasi lipid yang akan mengganggu membran plasma maupun tudung akrosom spermatozoa. (Arvioges dkk., 2021)

Kerusakan spermatozoa pada penyimpanan suhu 5°C akibat radikal bebas dan cold shock inilah merupakan penyebab utama disfungsi semen. Kualitas semen atau daya fertilisasi optimum spermatozoa harus dipertahankan dengan teknik preservasi atau pengawetan setelah semen ditampung dengan dicampur dengan larutan pengencer. Larutan pengencer yang digunakan harus memiliki kandungan nutrisi berfungsi untuk menjaga kelangsungan hidup spermatozoa, mencegah terjadinya cold shock pada saat pembekuan, menjaga tekanan osmotik dan pH yang sama dengan sel

sperma. Pengencer yang dibuat juga harus dapat mencegah terjadinya kematian spermatozoa pada saat proses penyimpanan, semen akan mengalami serangkaian paparan radikal bebas yang juga disebut ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang dapat menghancurkan ketidakjenuhan asam lemak yang terdapat pada bagian membran spermatozoa (Zein dkk., 2023).

Pengencer harus mengandung unsur kimia dan fisika yang mirip dengan semen, memiliki daya preservasi tinggi, dapat mempertahankan daya fertilisasi spermatozoa, dan tidak bersifat toksik terhadap spermatozoa). Tris kuning telur merupakan salah satu pengencer yang umum digunakan dan mengandung anti-cold shock berupa lesitin dan low density lipoprotein, krioprotektan berupa gliserol, dan sumber energi berupa glukosa, Kekurangan pada pengencer tris kuning telur sitrat adalah minimnya kandungan antioksidan sebagai penangkal radikal bebas dan anti-peroksidasi lipid karena kuning telur hanya mengandung protein mirip glutathion peroxidase dan superoksida dismutase yang berperan sebatas menunjang kemampuan antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa pereduksi radikal bebas yang dapat mengurangi kerusakan lipid, protein, dan karbohidrat. Bentuk antioksidan ada dua yaitu sintetis dan alami. Namun, antioksidan sintetis di jual dengan harga relatif tinggi, sedangkan antioksidan alami melimpah di alam seperti tumbungan bunga telang. (Rahmansyah dan Dyah, 2023)

Salah satu inovasi tersebut dengan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dalam pengencer. Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) adalah tanaman yang semua bagiannya memiliki manfaat bagi manusia. Bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) mengandung flavonoid, flavonol glikosida, antosianin, quersetin glikosida, kaempferol glikosida, mirisetin glikosida, Selain itu bunga telang juga mengandung tanin, terpenoid dan steroid (Pertwi dkk., 2024). Antosianin dalam bunga telang termasuk dalam golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Antosianin yang tinggi pada bunga telang juga merupakan senyawa organik yang berperan sebagai antioksidan yang berfungsi melawan radikal bebas, dengan cara mendonorkan salah satu elektronnya agar senyawa radikal bebas menjadi stabil (Palimbong dan Arlissha, 2020). Hal ini yang melatarbelakangi dilakukannya penelitian terkait MPU dan TAU semen sapi Bali pada pengencer ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dan TKT yang disimpan pada 5°C

1.2 Landasan teori

1.2.1 Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) Spermatozoa Sapi Bali

Membran plasma yang utuh (MPU) merupakan hal yang mutlak harus dimiliki spermatozoa yang baik karena membran plasma memegang peranan yang sentral dalam mengatur seluruh proses biokimia yang terjadi di dalam sel. Membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid yang mengandung asam lemak tak jenuh sehingga sangat rentan terhadap serangan radikal bebas. Radikal bebas akan merangsang terjadinya reaksi autokatalik yang akan merusak membran plasma. Fungsi keutuhan membran plasma spermatozoa adalah dalam metabolisme spermatozoa, reaksi akrosom, dan pengikat spermatozoa pada permukaan sel telur (Ardhani dkk., 2020).

Penurunan suhu secara mendadak yang merupakan faktor utama penyebab terjadinya kejutan dingin (*cold shock*). Kejadian kejutan dingin kemungkinan disebabkan

fase transisi dari membran lipid yang menyebabkan terjadinya fase pemisahan dan penurunan sifat – sifat permeabilitas secara selektif dari membran biologis sel. Pengaruh yang ditimbulkan akibat munculnya faktor ini adalah penurunan jumlah spermatozoa motil, pelepasan enzim, hilangnya aktivitas lesitin, perpindahan ion melewati membran dan penurunan kandungan lipid yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas structural membran plasma (Arvioges dkk., 2021).

Keberhasilan inseminasi buatan harus diiringi dengan kualitas spermatozoa yang baik, kualitas yang baik tidak hanya dilihat pada motilitas progresif spermatozoa tetapi juga dilihat keutuhan tudung akrosom spermatozoa. Tudung akrosom utuh merupakan lapisan yang menutupi nukleus, di dalamnya terdapat kumpulan enzim yang berfungsi membantu inti memasuki sitoplasma sel telur pada saat fertilisasi dengan merusak lapisan pembungkus sel telur melalui reaksi akrosom (Ardhani dkk., 2020)

Tudung akrosom memiliki fungsi yang cukup penting untuk keberhasilan fertilisasi saat perkawinan. Keutuhan dari tudung akrosom sangat penting pada saat preservasi, hal ini berhubungan dengan kandungan enzim – enzim yang terkandung di dalamnya. Kerusakan tudung akrosom akan menyebabkan enzim – enzim keluar yang menyebabkan hilangnya kemampuan spermatozoa saat pembuahan. Pada proses fertilisasi selain motilitas spermatozoa, keutuhan tudung akrosom dan membran plasma sangat menentukan kemampuan membuahi oosit. *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berlebihan akan mempengaruhi lipid membran terutama asam lemak poli tak jenuh sehingga terjadi peroksidasi lipid yang akan mengganggu membran plasma maupun tudung akrosom spermatozoa. Kerusakan atau perubahan tudung akrosom merupakan salah satu bentuk abnormalitas dari kepala spermatozoa. Perubahan bentuk tudung akrosom dapat berupa pembengkakan (*swollen*), pecah (*ruptered*), berkerut (*ruffled*) dan terlepas (*detached*) (Cahya, 2017)

1.2.2 Pengencer Tris Kuning Telur

Tris merupakan larutan yang mengandung asam sitrat dan fruktosa yang berperan sebagai penyangga (*buffer*), untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa serta mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, sumber energi dan melindungi spermatozoa dari kejut dingin (*cold shock*). Selain itu, tris mempunyai kemampuan dalam memberikan motilitas spermatozoa yang lebih tinggi karena tris lebih banyak mengandung zat – zat makanan, antara lain fruktosa, asam sitrat yang dapat dipanaskan sebagai buffer dan meningkatkan aktifitas spermatozoa. Senyawa bioaktif dalam kuning telur yang memberikan efek krioprotektif antara lain lesitin, fosfolipid, serta fraksi lipoprotein, yang berperan penting dalam melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat proses pendinginan dan pembekuan. Kuning telur juga mengandung glukosa yang lebih suka dipergunakan oleh sel–sel sperma sapi untuk metabolismenya daripada fruktosa yang terdapat di dalam. Kuning telur mengandung asam – asam amino, karbohidrat, vitamin, dan mineral untuk kebutuhan hidup spermatozoa. Selain itu, di dalam kuning telur terdapat senyawa anti kejut yang berperan melindungi spermatozoa dari kejut dingin. Kuning telur juga mengandung glukosa, bermacam – macam, protein, vitamin yang larut dalam air dan lemak serta viskositasnya yang dapat menguntungkan bagi spermatozoa (Widjaya, 2011).

Pengencer kuning telur mengandung lipoprotein dan fosfolipid yang mempertahankan serta mencegah kerusakan membran spermatozoa pada proses pembekuan dan susu skim memiliki kasein yang dapat melindungi spermatozoa selama penyimpanan pada suhu rendah. Bahan pengencer tris kuning telur memiliki kandungan yang sesuai dengan syarat bahan pengencer. Syarat bahan pengencer diantaranya memiliki antibiotik, bahan anti cold shock, bersifat buffer dan mengandung sumber nutrisi. Pengencer tris kuning telur mengandung tris amino methane, asam sitrat, laktosa, raffinosa, kuning telur, antibiotik *penicilyn* dan *streptomycin* serta aquades (Iskandari dkk., 2020). Tris kuning telur (TKT) memiliki kandungan yang relatif lengkap seperti Tris (*hydroxymethylaminometan*), asam sitrat, dan fruktosa. Fruktosa merupakan gugus gula sederhana dengan bobot molekul kecil seperti glukosa dan umum digunakan sebagai sumber karbohidrat sebagai penyedia energi untuk menjalankan fungsi fisiologi sel dalam proses kriopreservasi. Komponen-komponen dalam TKT dapat menjaga stabilitas pH, mempertahankan tekanan osmotik, menjaga keseimbangan elektrolit, mengikat butir-butir lemak, sumber energi, serta melindungi sel spermatozoa dari cold shock (Nabilla dkk., 2018)

1.2.3 Bunga Telang sebagai antioksidan

Bunga telang (*Clitoria Terenatea L.*) adalah bunga yang mengandung tinggi antioksidan yang biasanya tumbuh di pekarangan rumah, hutan atau bahkan pinggir kebun. Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif yang membentuk radikal bebas tidak reaktif yang tidak stabil. Antioksidan merupakan semua bahan yang dapat menunda atau mencegah kerusakan akibat oksidasi pada molekul sasaran. Dalam pengertian kimia antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron, tetapi dalam pengertian biologis lebih luas lagi, yaitu semua senyawa yang dapat meredam dampak negatif oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam (Sumartini dkk., 2020). Berikut gambar Bunga Telang:



Gambar 1. Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*)

Sumber : Handito, 2022

Kandungan fitokimia lain yang terdapat pada bunga telang seperti flavonoid. Kandungan flavonoid pada bunga telang dapat berperan sebagai sumber antioksidan. Kandungan flavonoid tersebut dapat dikembangkan pada berbagai industri pangan. Sehingga selain meningkatkan atribut mutu terhadap warna juga dapat memberikan efek terhadap kesehatan (Handito, 2022). Komposisi bunga telang yaitu asam fenolik, stilbenes, flavanol, antosianin, flavonol dan flavanon. senyawa fitokimia yang terdeteksi pada bunga telang yaitu flavonoid glikosida, seperti rutin, delfidin, kaempferol, quercetin dan malvidin (Choiriyah., 2020)

1.3 Tujuan

Tujuan dari Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak bunga telang pada pengencer tris kuning telur (TKT) terhadap membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi Bali selama penyimpanan pada suhu 5°C

Kegunaan penelitian ini diharapkan mampu menjadi sumber informasi ilmiah bagi calon peneliti untuk mendapatkan pengaruh penambahan ekstrak bunga telang sebagai antioksidan alami pada tris kuning telur (TKT) terhadap Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) spermatozoa sapi bali yang disimpan pada 5°C.

1.4 Rumusan Masalah

Penurunan kualitas spermatozoa sapi Bali selama penyimpanan semen cair pada suhu 5°C menjadi permasalahan utama dalam keberhasilan inseminasi buatan (IB). Kerusakan ini terutama disebabkan oleh paparan radikal bebas dan cold shock yang mempengaruhi integritas membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa. Penggunaan pengencer Tris kuning telur (TKT) memiliki keterbatasan dalam kandungan antioksidan yang cukup untuk melawan radikal bebas secara efektif. Keterbatasan ini menyebabkan kerusakan seluler yang berdampak pada daya fertilisasi spermatozoa.

Penelitian ini berfokus pada upaya menjaga kualitas spermatozoa dari sapi Bali, mengingat pentingnya populasi sapi Bali dalam peternakan di Indonesia. Upaya menjaga kualitas ini dilakukan melalui modifikasi pengencer semen cair. Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium, dengan fokus pada proses penyimpanan semen pada suhu 5°C.

Kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas dan cold shock terjadi selama proses penyimpanan semen cair. Untuk mengatasi masalah tersebut, penelitian ini mengusulkan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) ke dalam pengencer semen Tris Kuning Telur (TKT). Bunga telang kaya akan antioksidan seperti antosianin, yang diharapkan dapat melindungi membran plasma dan tudung akrosom spermatozoa dari kerusakan akibat radikal bebas. Oleh karena itu, penelitian ini dirancang untuk menjawab bagaimana efektivitas pengencer TKT dan ekstrak bunga telang dalam mempertahankan integritas membran plasma serta tudung akrosom semen sapi Bali selama penyimpanan pada suhu rendah.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret sampai pada Mei 2025. Pembuatan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak Unit Processing Semen dan di evaporasi di Laboratorium Kimia Radiasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar. Pengambilan sampel semen dilakukan di Lingkungan Kandang Ternak Sapi Potong Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Pengujian kualitas semen dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak Unit Processing Semen Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.

2.2 Materi penelitian

Materi penelitian yang digunakan adalah sapi Bali sebanyak 2 ekor dengan umur 3-5 tahun. Bahan yang digunakan yaitu tris (*hydroxymethyl*) aminomethane, asam sitrat, fruktosa, kuning telur ayam kampung, gliserol, penisilin, streptomisin, aquabidest, Bunga Telang, vaseline, Tissue, Sabun cuci piring, NaCl 0,9%, Aluminium foil, Kertas saring, parafilm, Alkohol, Formalin.

Alat yang digunakan antara lain adalah vagina buatan, termos, ember, tabung skala, alat tulis (pulpen, label, pensil), tabung reaksi, gelas ukur, spoit, gloves latex drying and sterilization oven, Casa (*Computer Assisted sperm analysis*), mikroskop Olympus Trinokuler, Photometer SDM 6, Hot plate, kuvet, Mikroskop, Timbangan elektrik, makro dan mikro pipet, minicropipet tip, tally counter, pinset, objek glass, cover glass, microtube, Syringe Filter dan Rotary Evaporation.

2.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan sampel semen segar sapi Bali. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan 5 kali ulangan (penampungan semen). Perlakuan dalam penelitian ini adalah jenis pengencer spermatozoa yang terdiri atas:

P0 = Tris Kuning Telur

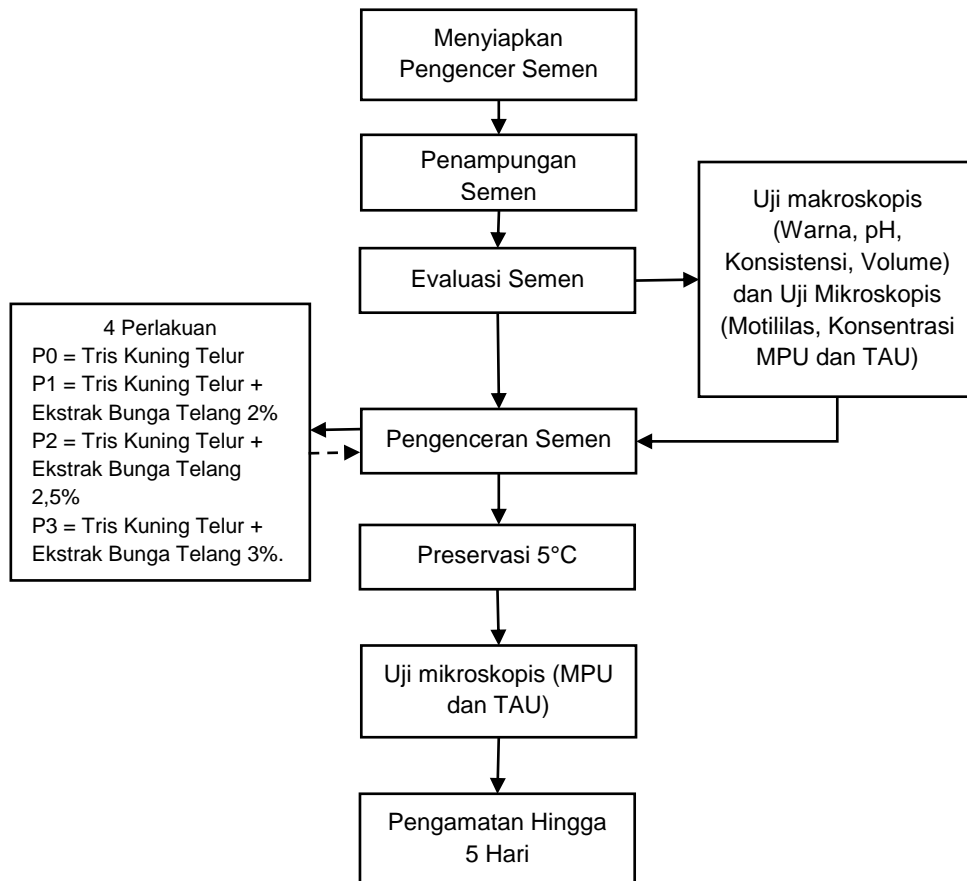
P1 = Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2%

P2 = Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2,5%

P3 = Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 3 %

2.4 Alur Penelitian

Proses pengenceran semen dengan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dan tris kuning telur (TKT) sebagai berikut:



Gambar 2. Diagram Alir Penggunaan Tris Kuning Telur dan Ekstrak Bunga Telang

Diagram alir penggunaan tris kuning telur dan ekstrak bunga telang diawali dengan menyiapkan larutan pengencer semen menggunakan empat perlakuan berbeda, yaitu P0 (Tris Kuning Telur), P1 (Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2%), P2 (Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 2,5%), dan P3 (Tris Kuning Telur + Ekstrak Bunga Telang 3%). Setelah semen ditampung, dilakukan evaluasi kualitas melalui uji makroskopis untuk mengamati warna, pH, konsistensi, konsentrasi dan volume, serta uji mikroskopis untuk mengukur motilitas, konsentrasi sperma, MPU, dan TAU. Selanjutnya, semen yang memenuhi standar diencerkan dengan larutan pengencer yang sesuai dengan perlakuan yang dipilih, kemudian dipreservasi pada suhu 5°C untuk memperlambat metabolisme sperma. Setelah preservasi, uji mikroskopis kembali

dilakukan untuk mengevaluasi MPU dan TAU guna memastikan kualitas sperma tetap terjaga. Proses ini diakhiri dengan pengamatan berkelanjutan terhadap motilitas sperma hingga mencapai kurang dari 50%, yang menandakan batas kualitas semen yang dapat digunakan.

2.5 Prosedur Penelitian

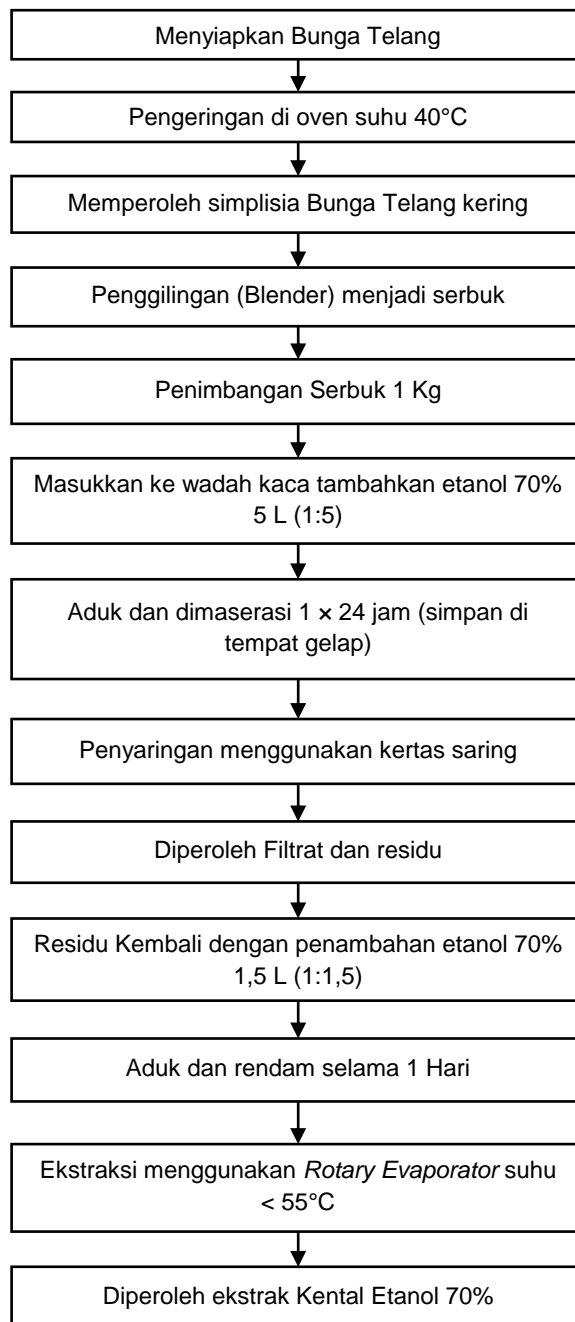
2.5.1 Pembuatan Pengencer Tris Kuning Telur

Bahan pengencer tris dibuat dengan mencampurkan 3.634g tris (hydroxymethylaminomethane), 1.7 g *citric acid*, 1.25g *fructose*, 6 ml *glycerol* (merck, Germany) kemudian dilarutkan ke dalam air 100 ml aquabidest. Buffer tris 80 ml ditambah kuning telur 20 ml, dihomogenkan dan disentrifugasi 3000rpm selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan antibiotik Benzyl penicillin (1000 IU/ml, Pharmacia danUpjohn, Belgium), *streptomycin sulphate* (1000 µg/ml, Pharmacia danUpjohn, Belgium) dan 7 ml gliserol. (Yendraliza, dkk., 2023)

2.5.2 Proses Ekstraksi Bunga Telang

Ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Bunga telang di keringkan di oven dengan suhu 40°C. kemudian diperoleh simplisia bunga telang kering, Simplisia bunga telang yang sudah kering kemudian diblender sehingga diperoleh serbuk (Erna dkk., 2019). Serbuk bunga telang kemudian ditimbang sebanyak 1 kg lalu dimasukkan ke dalam wadah kaca untuk ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 1:5 sebanyak 5L, aduk lalu diamkan selama 1x24 jam. Simpan ditempat yang gelap supaya terhindar dari sinar matahari. Sampel bunga telang yang telah dimaserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring sampai menghasilkan filtrat dan residu. Kemudian residu kembali sampel bunga telang yang telah dimaserasi untuk ditambahkan etanol sebesar 70% menggunakan perbandingan 1:1,5 sebanyak 1,5 L. Aduk sampai dalam kondisi merata, lalu tutup wadah, dan rendam selama 1 hari. Ekstrak etanol 70% pada bunga telang yang dihasilkan kemudian masuk pada tahapan uap dengan menggunakan rotary evaporator dengan tujuan untuk memperoleh ekstrak kental pada suhu kurang dari 55°C. (Fernanda dkk., 2022)

Proses pembuatan ekstrak bunga telang adalah sebagai berikut:



Gambar 3. Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Bunga Telang

2.5.3 Penampungan Semen

Penampungan Semen dilakukan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan sekali dalam seminggu dari pukul 06:00 Wita -09:00 Wita. Sebelum melakukan penampungan dengan vagina buatan terlebih dahulu menyiapkan air panas bersuhu 50-55°C, kemudian memasukan air panas pada klep di vagina buatan sampai $\frac{3}{4}$ bagian dan menutup klepnya. Setelah itu memasukan udara dengan cara meniup pada klep bagian atas lalu tutup klep. Beri pelican pada bagian muka vagina buatan. Setelah itu ukur suhu pada vagina buatan (42-44°C). Pasang tabung penampung pada corong pada vagina buatan, ikat kuat-kuat dengan karet. Bungkus tabung penampung dengan menggunakan Aluminium Foil agar tidak terkena cahaya matahari langsung. Setelah vagina buatan telah siap, selanjutnya penampungan semen dapat dilakukan. Siapkan ternak sapi betina pada kandang penampungan semen yang telah disediakan. Dekatkan sapi jantan pada sapi betina. Pada saat pejantan pertama kali naik, penis dibelokkan (Teasing) dan tidak masuk ke vagina betina pemancing sehingga pejantan akan turun dengan sendirinya. Pada saat sapi jantan menaiki sapi betina untuk kedua atau ketiga kalinya, baru penampungan semen dilakukan dengan cara mengarahkan penisnya untuk masuk kedalam vagina buatan. Jika ada gerakan ejakulasi yaitu dorongan yang keras dari sapi jantan, maka lepaskan vagina buatan bersamaan dengan turunnya sapi jantan dari sapi betina. Jika semen terlihat pada tabung penampung, maka lakukan gerakan angka delapan agar semua semen turun dan tertampung pada tabung penampung. Semen yang diperoleh langsung dibawa ke laboratorium untuk dievaluasi. (Papituan dkk., 2021)

2.5.4 Pengenceran Semen

Cara pengenceran yaitu dengan memasukkan bahan pengencer ke dalam tabung reaksi yang berisi semen melalui dinding tabung. Agar larutan homogen, dilakukan pencampuran dengan cara membolak-balikan tabung reaksi dengan perlahan-lahan. Volume pengencer dihitung berdasarkan rumus yang digunakan Nur., dkk (2023) :

$$\text{Jumlah Pengencer (ml)} = \frac{\text{Volume semen} \times \% \text{Motilitas} \times \text{Konsentrasi}}{\text{Konsentrasi Spermata yang diinginkan (ml)}} - \text{Volume}$$

2.5.5 Pembuatan Larutan HOST

Larutan HOST (*Hypo-Osmotic Swelling Test*) adalah larutan yang digunakan untuk pengamatan MPU. Larutan HOST merupakan larutan yang dibuat dengan mencampurkan natrium sitrat dan fruktosa ke dalam aquades. 0,1 ml semen dimasukkan dalam tabung dan ditambahkan 0,9 ml larutan HOST, didiamkan selama 15 menit kemudian diteteskan pada ujung kaca objek dan dibuat apusan lalu diamkan hingga mengering. Larutan HOST digunakan untuk mengamati bahwa membran spermatozoa utuh ditunjukkan dengan ekor sel spermatozoa yang menggulung, sedangkan sel yang tidak utuh ditunjukkan dengan ekor sel spermatozoa lurus. (Hermilinda dkk., 2023)

2.5.6 Pembuatan Larutan *Formasaline*

Larutan *Formasaline* adalah larutan yang digunakan untuk pengamatan TAU. Larutan *formasaline* terbuat dari campuran dari NaCl fisiologis + formalin 1% (Cahya dkk., 2017). Larutan formalin 1% dibuat dengan mencampurkan 1 ml formalin dengan 99 ml aquabidest, sehingga volumenya mencapai 100 ml. Lalu, ditambah dengan 100 ml NaCl fisiologi sehingga menjadi larutan *formasaline*. Tudung akrosom utuh dievaluasi dengan mencampurkan semen dengan larutan *formasaline* ke dalam tabung *appendolf* dengan perbandingan 1 : 4, kemudian dibiarkan beberapa saat lalu diteteskan diatas *object glass*. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai dengan adanya tudung akrosom yang berwarna gelap. (Cahyani dkk., 2020)

2.5.7 Parameter yang diamati

Parameter yang diamati pada penelitian ini adalah kualitas semen segar secara makroskopis dan kualitas spermatozoa yang meliputi pengamatan secara mikroskopis yang terdiri atas:

1) Makroskopis

Warna. Warna semen dapat dijadikan sebagai indikator untuk menduga konsentrasi spermatozoa yang berada di dalam semen secara cepat. Warna pada semen diamati secara visual setelah penampungan, semen yang baik adalah semen yang berwarna putih susu dan krem. Semen yang berwarna bening dapat dijadikan indikator bahwa semen tersebut tidak mengandung banyak spermatozoa, warna kuning menandakan kontaminasi urin, warna hijau adanya nanah dan warna merah atau coklat menandakan adanya darah atau hemolisis, sehingga warna semen dapat dijadikan sebagai salah satu kriteria penilaian kualitas semen dari tahap awal sebelum dilakukan penilaian lainnya. (Angelina dkk., 2022)

Bau. bau semen sapi berbau khas semen yang menunjukkan bahwa semen tersebut normal dan tidak terdapat kontaminasi. (Yendraliza dkk., 2019)

Volume. Volume semen merupakan banyaknya semen yang dihasilkan pada satu kali ejakulasi (Angelina dkk., 2022). kisaran normal volume semen sapi Bali antara 4 - 8 ml (Soi., 2016) Produksi spermatozoa cenderung meningkat seiring bertambahnya usia dan mencapai puncaknya pada kematangan seksual sementara mulai menurun secara bertahap pada usia yang lebih tua karena adanya perubahan degeneratif pada tubulus seminiferus. Selain dipengaruhi oleh umur ternak volume semen juga disebabkan oleh adanya perbedaan bangsa, berat badan, makanan serta manajemen penampungan (Zaqiyah dkk., 2024).

Derajat Keasaman (pH). Derajat keasaman (pH) semen diukur dengan menggunakan kertas indikator dengan cara meneteskan semen di atas kertas indikator. Selanjutnya, amati perubahan warna pada kertas indikator dan bandingkan dengan standar warna pH meter (Albertus dkk., 2022). Sperma sapi berkisar pH 6,2 sampai 6,8, biasanya agak asam. pH sangat mempengaruhi daya hidup spermatozoa, bahwa semakin rendah atau tinggi pH dari kisaran normal mampu membuat spermatozoa lebih cepat mati (Risky dkk., 2022).

Konsistensi Semen. Konsistensi atau kekentalan diperiksa dengan menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan-lahan. Semen yang konsistensinya sedang adalah semen yang akan segera kembali ke dasar tabung dengan kecepatan yang lebih lambat dibandingkan yang pertama, sementara itu sebagian semen masih menempel di dinding tabung (Maratun dkk., 2024).

2) Mikroskopis

Motilitas. Pemeriksaan motilitas spermatozoa memiliki dua kriteria yaitu berdasarkan pergerakan massa dan pergerakan individu. Persentase motilitas spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40×10. Penilaian terhadap persentase spermatozoa motil adalah spermatozoa yang bergerak progresif ditentukan secara subjektif pada sepuluh lapang pandang yang berbeda, nilai yang diberikan berkisaran antara 0% dan 100% (Blegur., dkk, 2020).

Konsentrasi. Konsentrasi spermatozoa adalah jumlah spermatozoa per mililiter semen yang merupakan salah satu parameter kualitas spermatozoa dalam menentukan jumlah betina yang dapat di IB menggunakan semen tersebut. Nilai konsentrasi ini menggambarkan fungsi tubulus seminiferus dari testes dengan rata-rata konsentrasi sekita 800-2000 juta/ml (Hendri., dkk, 2017). Untuk menghitung konsentras dapat menggunakan photometer SDM 6 (Minitube,Gremany). Kuvet yang berisi larutan dimasukkan ke dalam alat dengan posisi garis menghadapa ke depan lalu di tekan tombol zero. Setelah selesai kuvet di gantikan dengan kuvet baru yang berisi larutan dan semen kemudian ditekan tombol result untuk mendapatkan konsentras Spermatozoa

Membran Plasma Utuh (MPU). Pengamatan MPU dilakukan dengan mencampurkan semen dengan larutan HOST dengan perbandingan 1 : 10 (100 μ semen yang telah diberi perlakuan : 1 ml larutan HOST) kemudian dihomogenkan dan diinkubasi suhu 37°C selama 30 menit. Setetes semen diletakkan pada kaca preparat yang telah dihangatkan dan ditutup dengan gelas penutup. 200 sel spermatozoa diamati pada mikroskop cahaya perbesaran 40x. Identifikasi spermatozoa dengan membran plasma utuh yaitu ekor membengkok, ujung ekor melipat, bagian tengah membengkok, ekor memendek dan menebal (Khaeruddin., 2023) Membran plasma utuh semen sapi bali yang telah dipreservasi dengan rataaan 72% sedangkan membrane plasma utuh semen segar sapi bali berkisar 85-86% dengan rataaan 86,75% (Anwar., dkk 2015). Adapun rumusnya yaitu:

$$MPU\% = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Ekor Melingkar}}{\text{Jumlah Spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

Tudung Akrosom Utuh (TAU). 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. Evaluasi dilakukan pada minimal 200 spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Sukma dan Julia., 2021). Presentasi Tudung akrosom yang telah dilaporkan oleh Gustina., dkk (2024) yaitu berkisar 77-79%. Adapun Persentase Tudung Akrosom Utuh (TAU) dihitung berdasarkan rumus :

$$TAU\% = \frac{\text{Jumlah Sperma dengan akrosom berwarna}}{\text{Jumlah sperma yang dihitung}} \times 100\%$$

2.5.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan perangkat lunak *Statistical Program For Sosial Science* dengan *Repeated Measure ANOVA*

$$Y_{ij} = \mu + T_I \epsilon_{ij}$$

$$i = 1,2,3,\dots,t$$

$$j = 1,2,3,\dots,n$$

Ket :

Y_{ij} = Nilai Pengamatan pada perlakuan I (penambahan ekstrak bunga telang),
Ulangan j (banyak ulangan penampungan semen)

μ = Nilai tenga umum

T_I = Pengaruh perlakuan ke I (penambahan ekstrak bunga telang ke dalam semen)

ϵ_{ij} = Pengaruh acak (kesalahan percobaan) pada perlakuan ke I (penambahan ekstrak bunga telang ke semen) dan ulangan ke j (penampungan semen)

t = Banyak perlakuan penambahan ekstrak kedalam semen

n = Banyak ulangan penampungan semen

Hasil ANOVA menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan kelompok perlakuan mana saja yang berbeda secara nyata.