

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penerapan inovasi teknologi reproduksi menjadi salah satu alternatif bagi percepatan peningkatan populasi ternak sapi melalui penyerentakan birahi (sinkronisasi estrus) dan perkawinan melalui Inseminasi Buatan (IB) dengan menggunakan bibit unggul terseleksi (Gustiani dan Fahmi, 2022). Teknologi IB dilakukan dengan maksud agar diperoleh efisiensi dan efektifitas dalam penggunaan pejantan terpilih, serta menghindari terjadinya penyebaran penyakit melalui sarana reproduksi (Diwyanto, 2007). Penerapan teknologi IB pada ternak saat ini masih mengalami hambatan karena sulitnya mendapatkan kualitas semen beku yang memenuhi standar minimal untuk inseminasi. Untuk memperoleh semen dengan kualitas baik diperlukan medium pengencer yang mampu memberikan lingkungan dan nutrisi optimum bagi spermatozoa.

Kualitas spermatozoa dipengaruhi oleh bahan pengencer yang digunakan pada saat pengaplikasian, semakin jelek bahan pengencer yang digunakan maka akan berdampak pada penurunan kualitas semen karena *coolshock*, sehingga dibutuhkan bahan pengencer yang dapat meminimalisir penurunan kualitas dari spermatozoa. Pengenceran semen dilakukan untuk mengurangi kepadatan dan menjaga kelangsungan hidup spermatozoa. Bahan pengencer tersebut mengandung zat-zat makanan sebagai sumber energi dan tidak bersifat racun bagi spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari kejut dingin (*cold shock*), menghambat pertumbuhan mikroba serta bersifat sebagai penyangga. Untuk memperoleh semen dengan kualitas baik diperlukan medium pengencer yang mampu memberikan lingkungan dan nutrisi optimum bagi spermatozoa. Proses pengolahan semen mengakibatkan terjadinya kontak antara semen dan udara bebas yang mengandung oksigen. Hal tersebut menyebabkan tingginya aktivitas metabolisme oksidatif yang berpotensi menghasilkan radikal bebas. Maka dari itu, untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, biasanya di dalam pengencer semen ditambahkan senyawa antioksidan (Herdis dkk., 2009). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan antioksidan dalam pengencer semen dilakukan untuk meminimalisir atau menekan kerusakan membran spermatozoa akibat radikal bebas.

Kualitas spermatozoa dapat dilihat melalui beberapa parameter sederhana antara lain motilitas, viabilitas, dan abnormalitas (Mansour, 2009), keutuhan DNA (Morrel dan Rodriguez-Martinez, 2009) serta keutuhan membran plasma (Brito *et al.*, 2003). Pada proses pengujian kualitas semen beku, parameter Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) menjadi hal yang penting untuk diamati, karena pengujian MPU akan menentukan kemampuan

permeabilitas dari membran plasma dalam menjaga fisiologi spermatozoa, sedangkan pengujian TAU dapat menentukan kemampuan spermatozoa dalam menembus zona pelusida saat proses fertilisasi berlangsung dengan proses reaksi akrosom (Rizal, 2006). Keutuhan akrosom merupakan kunci keberhasilan fertilisasi karena hanya spermatozoa dengan akrosom utuh yang mampu melakukan penetrasi zona pelusida dan melakukan fusi dengan membran plasma. Salah satu bahan tanaman yang dapat dimanfaatkan dalam menjaga keutuhan akrosom tersebut dengan mencegah terjadinya oksidasi adalah Bunga Telang.

Kualitas spermatozoa beku sapi, termasuk sapi Bali, merupakan faktor penting dalam menentukan keberhasilan inseminasi buatan karena mencerminkan kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup dan melakukan fertilisasi setelah proses pembekuan dan pencairan. Proses kriopreservasi dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa akibat kerusakan membran plasma, gangguan fungsi metabolik, serta perubahan struktur akrosom yang dipicu oleh stres osmotik dan peningkatan radikal bebas selama proses freeze-thawing (Watson, 2000). Membran Plasma Utuh (MPU) menjadi indikator utama viabilitas spermatozoa karena berperan dalam menjaga keseimbangan ion dan kelangsungan fungsi sel, sedangkan Tingkat Keutuhan Akrosom (TAU) berkaitan erat dengan kemampuan spermatozoa dalam menembus selubung ovum pada proses fertilisasi (Garner & Hafez, 2008). Penurunan MPU dan TAU pasca pembekuan sering dikaitkan dengan tingginya kandungan asam lemak tak jenuh pada membran spermatozoa yang rentan terhadap peroksidasi lipid akibat stres oksidatif selama penyimpanan beku (Bailey et al., 2000). Oleh karena itu, evaluasi MPU dan TAU spermatozoa beku digunakan sebagai parameter esensial dalam menilai kualitas semen beku dan efektivitas perlakuan pengencer dalam mempertahankan potensi fertilitas spermatozoa sapi.

Kualitas semen beku sapi Bali sangat dipengaruhi oleh kemampuan spermatozoa mempertahankan integritas struktural dan fungsionalnya selama proses kriopreservasi, karena proses pembekuan dan pencairan semen dapat meningkatkan produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang memicu stres oksidatif dan menurunkan kualitas spermatozoa (Watson, 2000). Stres oksidatif tersebut berperan dalam terjadinya peroksidasi lipid membran plasma, kerusakan akrosom, serta gangguan metabolisme sel yang berdampak pada penurunan viabilitas dan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Aitken & Baker, 2006). Spermatozoa sapi, termasuk sapi Bali, memiliki kandungan asam lemak tak jenuh yang tinggi pada membran plasmanya sehingga sangat rentan terhadap kerusakan akibat radikal bebas selama penyimpanan beku (Hammerstedt et al., 1990). Upaya untuk menekan kerusakan oksidatif tersebut dilakukan melalui penambahan antioksidan eksogen ke dalam pengencer semen guna mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses kriopreservasi (Bailey et al., 2000). Bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) sering disebut juga

sebagai *butterfly pea* atau *blue pea* merupakan bunga yang khas dengan kelopak tunggal berwarna ungu, biru, merah muda (pink), dan putih. Kandungan flavonoid pada bunga telang dapat berperan sebagai sumber antioksidan (Handito *et al.*, 2022). Kandungan antioksidan dalam bunga telang berupa flavonoid yang tinggi dapat membantu melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif selama penyimpanan berlangsung sehingga dapat meningkatkan kualitas dan lama simpan semen beku. Kandungan antosianin pada bunga telang dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Hal inilah yang melatarbelakangi dilakukannya penelitian terkait pengaruh penambahan ekstrak bunga telang sebagai antioksidan dalam pengencer Tris Kuning Telur (TKT) terhadap Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) semen beku sapi bali.

1.2 Landasan Teori

1.2.1 Kualitas Semen Sapi Bali

Sapi Bali (*Bos sondaicus*) merupakan sapi asli Indonesia yang populasinya cukup besar dengan wilayah penyebaran yang luas. Sapi Bali memiliki keunggulan dibandingkan sapi lainnya karena mempunyai angka pertumbuhan yang cepat, adaptasi lingkungan yang baik, dan penampilan reproduksi yang baik. Sapi Bali merupakan jenis yang paling banyak dipelihara pada peternakan kecil karena fertilitasnya baik dan angka kematian yang rendah (Purwantara, 2012).



Gambar 1. Sapi Bali

Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2024

Evaluasi semen adalah salah satu parameter untuk memprediksi kemampuan seekor pejantan dalam melakukan fertilisasi. Parameter yang digunakan untuk menentukan kualitas semen adalah parameter makroskopik

dan mikroskopik. Parameter makroskopik merupakan parameter yang terdiri dari pengamatan volume, warna, konsistensi, dan derajat keasaman atau pH. Sedangkan parameter mikroskopik merupakan parameter yang diamati dengan bantuan mikroskop seperti konsentrasi, motilitas, abnormalitas, viabilitas, MPU, TAU, dan kinematika spermatozoa (Rahayu, 2014; Cenariu *et al.*, 2018; Moradpour, 2019).

Kualitas semen berperan sangat penting dalam pelaksanaan perkawinan, baik secara alami maupun IB. Pada pelaksanaan IB, salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB dapat ditentukan oleh kualitas spermatozoa. Pada saat penyimpanan spermatozoa, perubahan suhu yang ekstrim pada spermatozoa akan menyebabkan kerusakan sel, sehingga dapat menurunkan motilitas, viabilitas, tudung akrosom, dan keutuhan membran plasma. Tudung akrosom memiliki fungsi yang cukup penting untuk keberhasilan fertilisasi saat perkawinan. 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 (Arifiantini, 2012). Penyimpanan semen yang lebih lama akan semakin meningkatkan tingkat kematian spermatozoa karena rusaknya membran plasma yang berakibat pada terganggunya suplai energi spermatozoa sehingga menurunkan motilitas. Jumlah spermatozoa yang mati akan mempengaruhi spermatozoa yang masih hidup selama proses penyimpanan.

Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah radikal bebas yang terbentuk dari sebuah proses oksidasi biologis sel. ROS memiliki satu atau bahkan lebih molekul elektrone yang tidak berpasangan, bersifat tidak stabil dan mudah bereaksi dengan komponen sel lainnya. ROS terdiri dari superdioksida (O_2), hidroksil (OH), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan *peroxyl radical* (OOH). Pembentukan radikal bebas di dalam tubuh merupakan suatu proses yang berkelanjutan dan tidak dapat dihindari. ROS bersifat sangat reaktif dan bereaksi dengan molekul sel seperti protein, lipid, dan *Deoxyribonucleic acid* atau DNA (Amelia, 2018). Proses pembentukan radikal bebas tersebut mengakibatkan kerusakan struktural dan fungsi sel vital terganggu yang berimplikasi negatif pada kondisi patologis organisme.

Kerusakan DNA mengacu pada perubahan fisiko-kimia dalam DNA yang dapat mempengaruhi interpretasi dan transmisi informasi genetik. Kerusakan tersebut disebabkan oleh serangkaian tekanan eksogen dan endogen yang menyebabkan berbagai bentuk modifikasi molekuler kerusakan DNA yang disebabkan oleh ROS berasal dari sumber endogen atau eksogen. Pada DNA, ROS bereaksi dengan basa nitrogen dan deoksiribosa, menyebabkan reaksi oksidatif yang signifikan. Hal ini dapat menyebabkan mutasi, karsinogenesis,

apoptosis, nekrosis, dan penyakit keturunan. Proses terjadinya fragmentasi DNA yang disebabkan oleh pecahnya nukleosom menyebabkan masalah pada pemadatan dan penggulangan DNA di dalam kromatin. Kromatin memainkan peran penting dalam regulasi transkripsi gen, dan dengan demikian perubahan sifat fungsionalnya dapat mengakibatkan kesalahan yang menyebabkan mutagenesis (Juan dkk., 2021). Salah satu biologis hidup yang dapat mengalami stress oksidatif, yaitu spermatozoa.

Spermatozoa yang berada diluar tubuh ternak aktivitas metabolismenya akan mencapai situasi maksimum apabila disimpan pada suhu 37°C, namun dapat dipertahankan pada suhu 3-5°C. Selama penyimpanan spermatozoa akan mengalami kerusakan membran yang disebabkan oleh *Reactive oxygen species* (ROS) dan stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan penyebab utama kerusakan dari spermatozoa sehingga menghambat proses fosforilasi. Oksidasi fosforilasi yang terganggu menyebabkan peningkatan ROS, kadar ROS yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA. Membran plasma spermatozoa memiliki fosfolipid kadar yang tinggi menyebabkan sperma sangat rentan terhadap ROS (Blegur et al., 2020) . Maka dari itu, untuk mencegah kerusakan sel selama penyimpanan, maka diperlukan penambahan antioksidan, yang dapat menghambat reaksi oksidasi dan mengikat senyawa radikal bebas. Salah satu tanaman yang diduga memiliki nilai kandungan antioksidan tinggi, yaitu Bunga Telang.

1.2.3 Bunga Telang Sebagai Antioksidan

Bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) sering disebut juga sebagai butterfly pea atau blue pea merupakan bunga yang khas dengan kelopak tunggal berwarna ungu, biru, merah muda (pink) dan putih. Kandungan bunga telang diantaranya adalah tanin, saponin, fenol, triterpenoid, alkaloid, flobatanin, dan flavonoid. Kandungan flavonoid pada bunga telang dapat berperan sebagai sumber antioksidan (Handito dkk., 2022). Meskipun banyaknya jumlah senyawa flavonoid yang terdapat pada bunga telang, antosianin adalah yang paling utama. Antosianin merupakan salah satu golongan senyawa flavonoid yang memiliki sifat mudah terdegradasi oleh lingkungan seperti pH lingkungan dan oksigen. Antosianin dapat menjadi pewarna makanan alami, selain itu, antosianin juga dipercaya sebagai antioksidan (Purwaniati et al., 2020).



Gambar 2. Bunga Telang (*Clitoria Ternatea L.*)

Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2024

Antioksidan adalah senyawa yang dapat melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan radikal bebas. Antioksidan akan berinteraksi radikal bebas sehingga dapat mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Antioksidan alami berupa senyawa flavonoid yang merupakan kelompok senyawa polifenol yang berasal dari tanaman seperti teh, buah-buahan dan sayuran. Senyawa flavonoid dapat bekerja langsung untuk meredam radikal bebas oksigen seperti superoksida yang dihasilkan dari reaksi enzim xantin oksidase (Jannah *et al.*, 2022). Berdasarkan Rohman *et al.* (2007) bahwa aktivitas antioksidan dari bunga telang sebesar 5.33% aktivitas antioksidan dapat berasal dari senyawa selain fenolik dan flavonoid. Selain itu juga dapat diakibatkan oleh jenis flavonoid yang terkandung dalam daun tidak semuanya berfungsi sebagai antioksidan dan adanya sifat antagonis antar komponen fitokimianya (Laswati *et al.*, 2010; Kader *et al.*, 2011). Maka dari itu, ekstrak air bagian bunga, daun, dan akar memiliki potensi sebagai sumber antioksidan, terutama bagian bunga yang diekstrak dengan perlakuan perebusan sebagai bahan pengencer alami semen.

Bahan pengencer semen mempunyai fungsi antara lain sebagai sumber energi, pelindung spermatozoa terhadap kerusakan akibat pendinginan yang cepat (*anti cold shock*), menjadi penyangga (*buffer*) untuk mencegah efek terhadap perubahan, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, menghambat pertumbuhan bakteri, menambah volume semen, serta melindungi sel spermatozoa selama proses kualitas spermatozoa serta mampu memberikan lingkungan dan nutrisi optimum bagi spermatozoa (Toelihere, 1993). Syarat bahan pengencer antara lain mengandung unsur-unsur yang hampir sama dengan sifat fisik dan kimia semen, tidak boleh mengandung zat-zat yang bersifat racun baik terhadap spermatozoa maupun saluran kelamin hewan betina, serta tetap mempertahankan daya fertilitas spermatozoa (Purdy, 2006). Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas tinggi dibutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun saat *thawing* (Hoesni, 2017).

Tris hydroxymethyl aminomethane (Tris) pada umumnya digunakan sebagai komponen utama dalam pengencer karena memiliki kapasitas penyangga yang baik dan toksisitas yang rendah. Pengencer Tris *aminomethan* terdiri atas tris, asam sitrat, fruktosa dan air sebagai pencegah perubahan pH, mempertahankan tekanan osmotik, menjaga keseimbangan elektrolit, mengikat butir-butir lemak, sumber energi, melindungi sel spermatozoa selama proses pengawetan, adanya kuning telur dalam pengencer Tris *aminomethan* akan melengkapi fungsi pengencer dalam melindungi dan mempertahankan motilitas sel spermatozoa ketika terjadinya perubahan suhu dari 5 sampai -196°C (Nirwana *et al.*, 2017). Komponen utama tersebut ternyata dapat diperoleh dari bahan alami seperti ekstrak bunga telang yang memiliki kandungan antioksidan untuk melindungi sperma dari reaksi oksidasi pada proses *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Kandungan antioksidan dalam bunga telang berupa flavonoid yang tinggi dapat membantu melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif selama penyimpanan berlangsung sehingga dapat meningkatkan kualitas dan lama simpan semen beku. Kandungan antosianin pada bunga telang dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Kandungan senyawa fitokimia yang terdapat pada bunga telang lainnya seperti triterpenoid, flavonoid, kuinon, polifenol, saponin, dan steroid ini bekerja secara sinergis sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Turang *et al.*, 2023).

Membran Plasma Utuh (MPU)

Membran plasma dan persentase hidup spermatozoa saling terikat satu sama lain. Persentase hidup yang baik salah satunya ditandai oleh keutuhan membran plasma dari spermatozoa. Jika membran plasma mengalami kerusakan maka dapat mengurangi spermatozoa yang hidup. Keutuhan membran plasma spermatozoa secara fisiologis berperan untuk melindungi dan mempertahankan motilitas spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina, kapasitas, dan fertilisasi karena secara langsung maupun tidak langsung membran plasma memiliki kemampuan untuk berinteraksi dan menempel pada *cumulus oophorus* (Matrinez, 2004; Moce dan Graham, 2008). Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh (Surachman *et al.*, 2009). Membran plasma sangat berperan dalam terjadinya proses fertilisasi sehingga pengujian terhadap keutuhan membran plasma adalah indikator yang sangat penting untuk memprediksi daya fertilitas spermatozoa (Uysal dan Korkmaz, 2004).

Membran plasma spermatozoa tersusun atas lipid (*phospholipid*, *glikolipid*, dan kolesterol) serta protein. *Phospholipid* dan *glikolipid* merupakan senyawa asam lemak tak jenuh ganda sehingga mudah berikatan dengan radikal bebas. Kerusakan struktur membran akan mengganggu metabolisme sel spermatozoa.

Metabolisme yang tidak sempurna akan menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif yang mudah berikatan dengan asam lemak tak jenuh yang terkandung di dalam membran spermatozoa yang akan menyebabkan kerusakan membran. Kerusakan pada membran spermatozoa akan menyebabkan kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat, perubahan morfologi, lepasnya tudung akrosom dan pelepasan komponen intraseluler (Cahya dkk., 2017).

Hypoosmotic Swelling Test (HOST) adalah metode yang dilakukan untuk menguji keutuhan membran plasma spermatozoa dan mengevaluasi fungsional dari integritas membran plasma. Spermatozoa yang memiliki membran utuh jika ditempatkan pada media hipoosmotik akan bereaksi untuk meningkatkan volume air di dalam selnya agar cairan di dalam dan diluar spermatozoa seimbang. Akibat perbedaan tekanan osmotik dari larutan tersebut dengan tekanan osmotik luar sel lebih tinggi, maka larutan tersebut akan masuk kedalam sel dan menyebabkan pembengkakan. Hal ini terjadi karena larutan *hipoosmotik* akan masuk kedalam sel melewati membran plasma. Upaya ini menyebabkan terjadinya penyempitan pada membran yang menutupi ekor sehingga memaksa ekor spermatozoa melingkar di dalam membran spermatozoa. Sehingga jika ekornya menggelembung atau melingkar berarti membran plasmanya utuh (Susilawati, 2011).

1.2.5 Tudung Akrosom Utuh (TAU)

Tudung akrosom utuh (TAU) merupakan salah satu variabel penting dari kualitas spermatozoa untuk menentukan keberhasilan fertilisasi saat perkawinan. Tudung akrosom merupakan suatu selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi keluarnya materi genetik dan enzim-enzim dari bagian kepala spermatozoa sehingga harus tetap terjaga keutuhannya hingga terjadi kapasitasi. Kerusakan tudung akrosom akan menyebabkan enzim-enzim keluar yang menyebabkan hilangnya kemampuan spermatozoa saat fertilisasi (Arifiantini, 2012). Tudung akrosom perlu tetap utuh sebelum diinseminasikan agar enzim yang ada didalamnya dapat dilepaskan saat sperma sudah mencapai ovum di dalam organ reproduksi betina (Ardhani *et al.*, 2020).

Kelainan atau kerusakan pada tudung akrosom ini merupakan salah satu bentuk abnormalitas dari kepala spermatozoa yang dapat disebabkan baik oleh abnormalitas primer maupun sekunder pada kepala spermatozoa. Perubahan pada tudung akrosom ini dapat berupa pembengkakan (*swollen*), pecah (*ruptured*), berkerut (*ruffled*) dan terlepas (*detached*). Rusaknya tudung akrosom akan menyebabkan berkurangnya kemampuan fertilisasi spermatozoa (Arvioges *et al.*, 2021). kerusakan akrosom tidak selalu menimbulkan kematian pada spermatozoa, namun sangat berpengaruh terhadap daya fertilitas spermatozoa.

Kerusakan akrosom sebesar 15-25% pada semen yang diolah menjadi semen beku akan menyebabkan infertilitas.

Proses Metabolisme spermatozoa saat di inkubasi terlalu lama menghasilkan reaksi peroksidatif lipid apabila bereaksi dengan radikal bebas. Peroksidasi lipid dapat mengubah struktur sel sperma dan menyebabkan mantel pelindung kepala sperma pecah dan berakibat rusaknya TAU spermatozoa. Kerusakan tudung akrosom dapat meningkat apabila kerusakan membran plasma juga meningkat akibat adanya proses kimiawi yang terjadi selama inkubasi (Garner dan Hafez, 2008).

1.2.6 Kualitas Semen Beku Sapi Bali

Semen beku merupakan teknologi yang efektif untuk mendapatkan pejantan unggul dari dalam dan luar negeri, dapat disimpan dalam waktu yang sangat lama dan bebas dari penyakit menular yang disebabkan kawin alam dengan penerapan bioteknologi Inseminasi Buatan (IB). Mutu semen beku harus selalu terjaga agar fertilitasnya tetap baik. Semen akan mengalami penurunan kualitas sekitar 10 - 40% pada saat pembekuan. Masalah yang sering menyebabkan penurunan kualitas semen adalah pada proses pengolahan terutama pada tahap pembekuan. Pada proses pembekuan semen akan mengakibatkan terjadinya *cold shock* dan perubahan intraseluler yang berkaitan dengan pembentukan kristal-kristal es (Pratiwi *et al.*, 2014). Penambahan *krioprotektan* bertujuan untuk mengurangi perubahan biofisik yang dapat mengganggu fungsi sel akibat *cold shock*, seperti pola pergerakan sperma yang abnormal, penurunan motilitas, kerusakan akrosom, kerusakan membran plasma, dan hilangnya komponen-komponen intrasel (Afiati *et al.*, 2013).

Proses pendinginan, pembekuan dan *thawing* mengakibatkan stres fisik dan kimia pada membran spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas dan kemampuan memfertilisasi ovum (Susilawati, 2013). Sukmawati *et al.* (2014) menyatakan bahwa pada saat proses pembekuan dan *thawing* sperma mengalami berbagai perubahan suhu dan tekanan osmotik sehingga menurunkan kualitas semen diantaranya adalah penurunan motilitas, viabilitas dan membran plasma utuh. Menurut Salim *et al.* (2016) durasi *thawing* yang singkat belum menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas metabolisme spermatozoa yang berakibat menurunkan daya tahan hidup. Peningkatan aktivitas metabolisme menghasilkan asam lemak dalam konsentrasi yang tinggi akibat peroksidasi lipid. Membran spermatozoa tersusun dari protein lipid, dan karbohidrat yang tersusun secara non kovalen dan sangat sensitif terhadap faktor-faktor ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionic dan polaritas .

Proses *cooling*, *freezing*, dan *thawing* sangat mempengaruhi stabilitas dan fungsi hidup sel membran. Penurunan kualitas spermatozoa diatas terjadi karena adanya kerusakan struktur membran selama pendinginan sehingga proses metabolisme spermatozoa terganggu. Penurunan persentase motilitas spermatozoa setelah pendinginan disebabkan oleh sedikitnya spermatozoa yang

memiliki cadangan energi yang cukup untuk bergerak, karena spermatozoa yang telah mengalami cekaman dingin (suhu rendah) dapat mengalami destabilisasi membran (Nugroho *et al.*, 2014).

Kualitas semen cepat menurun akibat dari proses kriopreservasi (pengawetan/ penyimpanan) karena faktor termal (cekaman dingin/*cold shock*), mekanikal (terbentuknya kristal es intraseluler), kimiawi (komponen pengencer), dan stres osmotik (tekanan osmotik pengencer). Pengencer memiliki peran penting dalam meminimalkan risiko menurunnya kualitas semen saat proses pengolahan maupun pasca pengolahan sehingga dibutuhkan bahan pengencer yang dapat meminimalisir penurunan kualitas spermatozoa. Kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas pada proses *prosesing* dan penyimpanan semen dapat menurunkan kualitas spermatozoa sehingga dibutuhkan antioksidan.

1.3 Tujuan dan Kegunaan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak bunga telang dalam pengencer Tris Kuning Telur (TKT) terhadap kualitas Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) spermatozoa sapi Bali pasca *thawing*.

Kegunaan dari penelitian ini diharapkan mampu menjadi sumber informasi terkait penambahan ekstrak bunga telang dalam pengencer Tris Kuning Telur (TKT) sebagai antioksidan terhadap kualitas membrane plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) spermatozoa sapi Bali pasca *thawing*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan september 2024 - mei 2025 bertempat di *Animal Center* (kandang sapi potong), Laboratorium Reproduksi Ternak *Unit Prosesing Semen*, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.2 Materi penelitian

Materi penelitian yang digunakan adalah semen pejantan sapi Bali sebanyak 3 ekor dengan umur 5 – 6 tahun. Alat yang digunakan antara lain: vagina buatan, tabung sperma, mikroskop trinokuler, aluminium foil, kertas label, kertas saring, mikropipet, *objek glass*, *coverglass*, bunsen, *beaker glass*, labu erlenmeyer, *filling sealing*, *container*, *photometer* SDM 6, kuvet, dan sarung tangan.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: Tris *aminomethan*, ekstrak bunga telang, asam sitrat, *fructose*, *streptomycin*, *aquadest*, *penicillin*, *straw*, larutan NaCl 0,9%, *vaseline*, aquabidest, kuning telur ayam, *tissue*, spirtus, gliserol, alkohol 70%, larutan formosalin, dan larutan HOST.

2.3 Tahapan dan prosedur penelitian

2.3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan. Adapun ulangan dilakukan sebanyak 5 kali ulangan (*Processing* semen) dengan perlakuan sebagai berikut:

P0 = TKT tanpa penambahan ekstrak bunga telang

P1 = TKT + Pemberian ekstrak bunga telang 2%

P2 = TKT + Pemberian ekstrak bunga telang 2,5%

P3 = TKT + Pemberian ekstrak bunga telang 3%

2.3.2 Prosedur penelitian

2.3.2.1 Penampungan Semen

Metode dalam koleksi semen kambing dilakukan menggunakan vagina buatan. Koleksi semen dilakukan sekali dalam seminggu sekitar pukul 07.00-09.00 Wita. Frekuensi penampungan semen dilakukan sebanyak 5 kali. Suhu vagina buatan pada saat penampungan berkisar antara 42°C- 44°C (Salisbury *et al.*, 1985), untuk mencapai suhu tersebut, sebaiknya digunakan air hangat yang bersuhu 50°C- 55°C. Setelah vagina buatan selesai dipersiapkan, pejantan dirangsang dengan betina pemancing. Pejantan kemudian akan menaiki ternak betina pancingan, lalu saat itu juga penis pejantan harus segera dimasukkan kedalam vagina buatan hingga terjadi ejakulasi. Semen yang telah tertampung harus

segera diperiksa kualitasnya secara makroskopis kemudian diolah lebih lanjut di laboratorium untuk diperiksa kualitasnya secara mikroskopis.

2.3.2.2 Evaluasi Semen Secara Makroskopis

Pemeriksaan semen secara makroskopis meliputi pemeriksaan volume (ml), warna, derajat keasaman atau pH, dan konsistensi. Lebih lanjut akan dirincikan sebagai berikut.

a. Volume

Volume semen dievaluasi dengan cara melihat skala pada tabung penampung. Volume semen per ejakulat berbeda menurut bangsa, umur, ukuran badan, tingkatan makanan, frekuensi penampungan dan berbagai faktor lain. Selain itu, teknik, metode penampungan dan persiapan alat penampungan mempengaruhi volume semen yang dihasilkan (Saili, 1999).

b. Warna

Warna dievaluasi dengan melihat secara visual, yaitu warna putih susu hingga krem. Semen berwarna gelap sampai merah muda menandakan adanya darah. Warna kecoklatan menunjukkan adanya darah yang telah mengalami dekomposisi. Warna coklat muda atau warna kehijau-hijauan menunjukkan kontaminasi dengan feses (Feradis, 2010).

c. Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar menggunakan ose, selanjutnya dilihat pH semen dengan menggunakan pH spesial *indicator paper* pada kisaran pH 6.4 – 8.0 (Diansyah *et al.*, 2022).

d. Konsistensi

Konsistensi semen adalah derajat kekentalan semen dapat diperiksa dengan cara menggoyangkan tabung berisi semen. 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). Semakin tinggi konsentrasi maka konsistensi semen akan semakin pekat. Hal tersebut menunjukkan tingkat konsistensi semen (Butar, 2009)

2.3.2.3 Evaluasi Semen Secara Mikroskopis

Pemeriksaan semen secara mikroskopis meliputi pemeriksaan membrane plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU). Lebih lanjut akan dirincikan sebagai berikut.

a. Motilitas

Motilitas spermatozoa merupakan salah satu kriteria penentu kualitas spermatozoa ditinjau berdasarkan banyaknya spermatozoa yang bergerak progresif, dengan maksud agar sampai di dalam alat reproduksi berina untuk fertilisasi. Penilaian motilitas spermatozoa sangat penting karena motilitas umumnya digunakan sebagai parameter kesanggupan membuahi. Energi untuk motilitas bersumber pada bagian ekor spermatozoa. Adapaun energi yang digunakan untuk pergerakannya di pengaruhi oleh sumber energi seperti fruktosa, dan cairan elektrolit seperti Na^+ , Ca^+ , Cl^- , dan laktat.

b. Membran Plasma utuh (MPU)

Membran plasma utuh diuji dengan mencampurkan sperma dengan larutan HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*) dengan perbandingan 1:10 (100 μl sperma : 1 ml larutan HOST), dilanjutkan dengan inkubasi oven selama 30 menit. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop trinokuler dengan pembesaran 400 \times dan minimal 200 sel spermatozoa (Diansyah *et al.*, 2020). Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau menggebu, sedangkan yang rusak ditandai dengan ekor yang lurus.

c. Tudung Akrosom Utuh (TAU)

Pengamatan Tudung Akrosom Utuh (TAU) dilakukan dengan cara mencampurkan semen dengan larutan formosaline dengan perbandingan 1:4. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop Trinokuler pembesaran 400 \times , sebanyak minimal 200 sel spermatozoa. Tudung akrosom utuh ditandai dengan ujung kepala yang berwarna hitam (Cahya *et al.*, 2017).

2.3.2.4 Proses Ekstraksi Bunga Telang

Proses ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dilakukan untuk memperoleh senyawa bioaktif berupa flavonoid dan antosianin yang berperan sebagai antioksidan alami (Handito *et al.*, 2022). Bunga telang segar dipilih berdasarkan kondisi fisik yang baik, kemudian dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran dan kontaminan yang dapat memengaruhi kualitas ekstrak (Harborne, 1996). Selanjutnya bunga telang dikeringkan pada suhu ruang tanpa paparan sinar matahari langsung hingga mencapai kondisi kering, dengan tujuan mencegah degradasi senyawa aktif yang sensitif terhadap panas dan cahaya (Harborne, 1996). Bunga telang kering kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisia sebagai bahan baku ekstraksi (Setyaningsih *et al.*, 2019).

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol atau aquades, karena metode ini efektif untuk mengekstraksi senyawa

flavonoid dan antosianin yang bersifat polar serta tidak melibatkan pemanasan tinggi yang dapat merusak senyawa aktif (Setyaningsih et al., 2019). Proses maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam pelarut dengan perbandingan tertentu selama 24–48 jam pada suhu ruang sambil dilakukan pengadukan secara berkala untuk meningkatkan kontak antara bahan dan pelarut (Sari et al., 2018). Setelah proses maserasi selesai, larutan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu (Harborne, 1996). Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *water bath* pada suhu rendah hingga diperoleh ekstrak kental bunga telang, yang selanjutnya disimpan dalam wadah tertutup pada suhu dingin hingga digunakan sebagai bahan tambahan dalam pengencer semen (Handito et al., 2022).

2.3.2.5 Pembuatan Bahan Pengencer Semen

Metode yang digunakan berdasarkan Amaliah *et al.*, (2023) yang dimodifikasi; menimbang bahan - bahan yaitu Tris hydroxyl methyl amine 3.63 gr, asam sitrat 1,78 gr, dan fruktosa 1,25 gr ke dalam labu ukur, lalu menambahkan aquabidest hingga mencapai 100 ml kemudian dihomogenkan selama 15 menit. Langkah selanjutnya 80 ml larutan tris yang telah dibuat dimasukkan kedalam labu ukur dan menambahkan kuning telur 20 ml sampai mencapai 100 ml, kemudian dihomogenkan selama 10 sampai 20 menit. Pengencer dibagi menjadi 4 bagian dengan pemberian ekstrak bunga telang yang berbeda sesuai perlakuan. Pembuatan Larutan HOST.

Larutan HOST adalah larutan yang digunakan untuk pengamatan MPU. Larutan HOST dibuat dari campuran NaCl dengan *aquabidest* (Ondho, 2020). Larutan HOST ini dibuat dengan cara mencampurkan 20 ml NaCl fisiologis dengan 80 ml *aquabidest*, sehingga volumenya mencapai 100 ml.

2.3.2.6 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.

2.3.2.7 Pengenceran semen

Pengenceran semen dilakukan dengan mencampurkan semen ke dalam pengencer tris kuning telur. Semen diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi spermatozoa sebanyak 25 juta/*straw* (0,25ml). Berdasarkan Tambing *et al.* (2003), volume pengenceran yang akan dibutuhkan dapat dihitung dengan persamaan berikut.

Volume Pengencer

$$= \left[\frac{\text{motilitas} \times \text{konsentrasi sperma} \times 0,25 \times \text{vol. semen}}{25 \times 10^6} \right] - \text{vol. semen}$$

2.3.2.8 Pembekuan Semen

Setelah diencerkan, selanjutnya dilakukan *filling* dan *sealing* lalu di ekuilibrasikan pada suhu 3 - 5°C selama 2 - 3 jam di dalam lemari pendingin, kemudian dilakukan pre freezing dengan meletakkan staw ±10 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 10 - 15 menit. Proses selanjutnya adalah memasukkan staw kedalam goblet dan dicelupkan kedalam nitrogen cair dengan suhu -196°C yang kemudian disimpan kedalam kontainer penyimpanan (Diansyah *et al.*, 2020).

2.3.2.9 Thawing

Evaluasi *Post Thawing* dilakukan, dengan cara melakukan thawing terlebih dahulu dalam air hangat (37°C) selama 20 detik. Semen yang telah di *thawing*, dikeluarkan seluruhnya dan simpan dalam mikrotube.

2.3.3 Parameter yang diukur

a. Membran Plasma Utuh (MPU)

Membran plasma utuh diuji menggunakan larutan *Hypo-osmotic Swelling Test* (HOST) dengan perbandingan 1:10 (100 µl sperma yang diberi perlakuan : 1 ml larutan HOST), dilanjutkan dengan Inkubasi selama 30 menit di suhu 37°C. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop trinokuler dengan pembesaran 400× dan minimal 200 sel spermatozoa (Diansyah *et al.*, 2020). Spermatozoa dengan ekor melingkar menandakan bahwa membran plasmanya utuh, sedangkan spermatozoa yang ekornya lurus menandakan membran plasmanya rusak (Ondho, 2020). Menggunakan rumus :

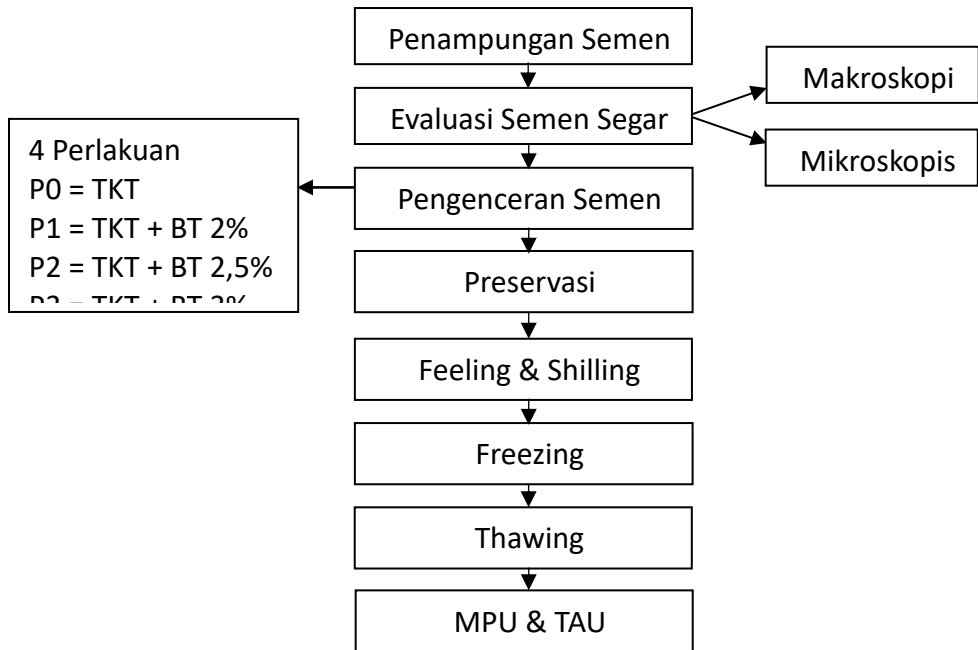
$$\% \text{ MPU} = \frac{\text{jumlah spermatozoa ekor melingkar}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

b. Tudung Akrosom Utuh (TAU)

Pengamatan Tudung Akrosom Utuh (TAU) dapat dilakukan dengan cara mencampurkan semen yang akan diuji dengan larutan formaline dengan perbandingan 1 : 4 ke dalam tabung minitube. Lalu, diamkan selama 5 menit dan diteteskan di atas object glass lalu ditutup dengan cover glass. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop Trinokuler menggunakan pembesaran 400x sebanyak minimal 200 sel spermatozoa. Tudung *akrosom* utuh ditandai dengan ujung kepala yang berwarna hitam (Cahya *et al.*, 2017). Menggunakan perhitungan yaitu:

$$\% \text{ TAU} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang ujung kepala menghitam}}{\text{jumlah spermatozoa yang dihitung}} \times 100\%$$

Alur kerja penelitian pada gambar 3:



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian

2.4 Analisis Data

Data yang diperoleh pada penelitian ini di tabulasi pada *Microsoft Excel*. Selanjutnya dianalisis menggunakan analisis varian satu arah (ANOVA). Apabila hasil uji menunjukkan perlakuan berpengaruh nyata terhadap peubah yang dievaluasi, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

