



## Pengaruh Kombinasi Pengencer Susu Kacang Kedelai Sangrai dan Sitrat Modifikasi terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Landrace

Kristina Loka<sup>1</sup>✉, W. Marlene Nalley<sup>2</sup>, Petrus Kune<sup>3</sup>

(1-3) Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana

✉ Corresponding author  
([kristinaloka525@gmail.com](mailto:kristinaloka525@gmail.com))

Article info:

Received 25 April 2024 ; Accepted 1 June 2024; Published 20 June 2024

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of the combination of roasted soy milk (RSM) diluent and modified citrate (C) diluent on the quality of landrace boar spermatozoa. The material used in this study was fresh semen of 2-year-old male landrace pigs. This study used a complete randomized design method consisting of 5 treatments and 5 repeats. The treatment was, T0: roasted soybean milk (RSM) 100% + citrate (C) 0%, T1: RSM 75% + C 25%, T2: RSM 50% + C 50%, T3: RSM 25% + C 75% and T4: RSM 0% + C 100%. Diluted semen was stored at 18-20°C and evaluated every 8 hours. The parameters studied are motility, viability, abnormalities and survival of spermatozoa. The data obtained were analyzed using analysis of variance and followed by Duncan's test. The results showed that T3 significantly differed ( $P < 0,05$ ) on motility, viability and liveability, but not significantly different ( $P > 0,05$ ) on spermatozoa abnormalities. The quality of spermatozoa in T3 treatment was  $45.80 \pm 1.30\%$  motility,  $54.27 \pm 4.71\%$  viability,  $6.26 \pm 0.47\%$  abnormality and  $40.00 \pm 0.00$  hours survival. It can be concluded that the combination of roasted soy milk diluent (RSM) 25% + citrate (C) 75% was an effective treatment in maintaining the quality of landrace boars spermatozoa for 40 hours of storage.

**Keywords:** Egg yolk, citric, soybean milk, boar spermatozoa.

### Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh kombinasi pengencer susu kacang kedelai sangrai (SKKS) dan pengencer sitrat (S) modifikasi terhadap kualitas spermatozoa babi landrace. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar babi landrace jantan berumur 2 tahun. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap yang terdiri dari 5 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan tersebut yaitu P0: susu kacang kedelai sangrai (SKKS) 100% + sitrat (S) 0%, P1: SKKS 75% + S 25%, P2: SKKS 50% + S 50%, P3: SKKS 25% + S 75% dan P4: SKKS 0% + S 100 %. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 18-20°C pasca pengenceran dan dievaluasi setiap 8 jam. Parameter yang diamati adalah motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analysis of variance dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan P3 berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup, namun tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap abnormalitas spermatozoa. Nilai kualitas spermatozoa pada perlakuan P3 yaitu motilitas  $45,80 \pm 1,30\%$ , viabilitas  $54,27 \pm 4,71\%$ , abnormalitas  $6,26 \pm 0,47\%$  dan daya tahan hidup  $40,00 \pm 0,00$  jam. Dapat disimpulkan bahwa kombinasi pengencer susu kacang kedelai sangrai (SKKS) 25% + sitrat (S) 75% merupakan perlakuan efektif dalam mempertahankan kualitas spermatozoa babi landrace selama 40 jam penyimpanan.

**Kata kunci:** Kuning telur, sitrat, susu kacang kedelai, spermatozoa babi landrace

## PENDAHULUAN

Penggunaan babi pejantan terseleksi yang digunakan untuk meningkatkan mutu genetik ternak mempunyai jumlah dan kualitas yang terbatas yang disebabkan oleh faktor genetik, lingkungan dan pakan yang diberikan. Usaha untuk mempertahankan kualitas semen dan memperbanyak hasil ejakulasi dari pejantan unggul adalah dengan melakukan pengenceran semen menggunakan beberapa bahan pengencer. Pengenceran semen yaitu salah satu tahapan dengan program IB yang bertujuan menghasilkan spermatozoa yang berkualitas dan memungkinkan peningkatan jumlah betina yang diinseminasi.

Pengenceran semen dibutuhkan bahan-bahan pengencer yang berfungsi meningkatkan volume untuk perhitungan dosis inseminasi buatan (IB), sehingga semen dapat diawetkan dan disimpan dalam waktu lama. Susu kacang kedelai merupakan salah satu sumber lesitin dan telah terbukti mampu mempertahankan kualitas spermatozoa. Rahayu dan Marhendra (2014) menyatakan bahwa kedelai merupakan bahan pengencer mengandung lesitin untuk melindungi spermatozoa dari cekaman dingin (cold shock). Lesitin bekerja dalam spermatozoa dengan cara pengencer berikatan dengan membran plasma untuk menyelimuti membran plasma sehingga kestabilan membran spermatozoa dapat terjaga sehingga dengan demikian kualitas spermatozoa dapat dipertahankan (Purwoistri et al., 2013). Selain itu, susu kedelai juga mengandung karbohidrat, protein, lipoprotein dan lesitin yang berfungsi dalam mempertahankan dan melindungi integritas membran plasma spermatozoa (Aboagla dan Terada, 2004; Bergeron dan Manjunath, 2006).

Salah satu pengencer yang umum digunakan dalam preservasi spermatozoa yaitu sitrat. Natrium sitrat merupakan penyangga yang mampu mempertahankan kestabilan pH pengencer, sedangkan kuning telur merupakan komponen penting dalam pengencer semen, yang mengandung glukosa sebagai sumber energi dan terutama

mengandung lipoprotein dan lesitin sehingga dapat melindungi integrasi selubung lipoprotein dari sel spermatozoa (Feradis, 2010; Nalley et al., 2011). Selama preservasi spermatozoa mengalami proses metabolisme, menghasilkan zat peroksida lipid, apabila bereaksi dengan radikal bebas, dapat menyebabkan integritas dan kehidupan sel terganggu sehingga mengakibatkan kematian spermatozoa. Untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, di dalam pengencer semen perlu ditambahkan senyawa antioksidan yaitu penambahan ekstrak daun kelor etanol. Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam) merupakan antioksidan bahan alam yang banyak mengandung protein, karoten, vitamin A, vitamin C, vitamin E, mineral, asam amino, serta senyawa flavonoid dan phenol dengan total kandungan 1014,51 mg/L (Anwar et al., 2007). Vitamin C dan E bermanfaat untuk mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa akibat meningkatnya produksi radikal bebas selama proses pengenceran dan penyimpanan semen (Kurniasih, 2013). Menurut Fafo et al. (2016) menyatakan bahwa penambahan ekstrak daun kelor ke dalam pengencer sitrat kuning telur mampu mempertahankan kualitas spermatozoa babi, dengan level terbaik yaitu 5%. Berkaitan dengan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi pengencer susu kacang kedelai sangrai dan pengencer sitrat modifikasi terhadap kualitas spermatozoa babi landrace.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Yayasan Williams dan Laura, di Tilog, desa Oelnasi, Kecamatan Kupang Tengah, Kabupaten Kupang, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Penelitian ini berlangsung selama 5 minggu

### Materi Penelitian

Semen segar yang digunakan berasal dari babi landrace jantan dengan umur 2 tahun, memiliki kondisi tubuh proporsional dan

sehat, organ reproduksi normal (testisnya simetris) serta sudah terlatih untuk penampungan semen. Babi tersebut dipelihara pada kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum.

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian yaitu: (1) satu paket alat penampungan semen, (2) peralatan evaluasi semen terdiri dari: mikroskop, object glass dan cover glass, heating table, kertas pH, hemocytometer dan counting chamber lengkap dengan pipet eritrosit, tabung berskala, pipet, sentrifus, (3) peralatan pengencer semen terdiri dari: gelas piala, gelas ukur, pinset, kapas, spoit, timbangan, baskom stainless, gunting, stirrer dan spin bar, mortar dan alu, spatula, aluminium foil, tabung erlenmeyer, tabung perlakuan, rak tabung, box styrofoam sebagai alat penyimpanan semen dengan suhu 18-20°C yang dikontrol dengan termometer.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu: semen segar babi landrace, susu kacang kedelai sangrai, sitrat, kuning telur, ekstrak daun kelor 1%, alkohol 70%, antibiotik (penicilin dan streptomycin), larutan NaCl fisiologi dan pewarna eosin-negrosin, air hangat, aquabidest, kertas saring, kertas label, tisu.

### Metode

Penelitian ini menggunakan metode rancangan acak lengkap, yang terdiri dari lima perlakuan dan 5 ulangan sehingga terbentuk 25 unit percobaan.

Perlakuan yang diujicobakan yaitu:

P0: Susu kacang kedelai sangrai-kuning telur (SKKS-KT) 100% + Sitrat-kuning telur (S-KT) 0%;

P1: SKKS-KT 75% + S-KT 25%;

P2: SKKS-KT 50% + S-KT 50%;

P3: SKKS-KT 25% + S-KT 75%;

P4: SKKS-KT 0% + S-KT 100%.

Semua bahan yang diuji ditambah 1% ekstrak etanol daun kelor (EEDK) sebagai sumber antioksidan alami.

### Tahap Pembuatan Pengencer

Pembuatan kuning telur (KT) yaitu: telur dibersihkan dengan kapas yang dibasahi dengan alkohol 70%. Pecahkan kerabang pada bagian yang lancip, keluarkan semua putih telur secara berhati-hati, dan pisahkan dari kuning telur. Setelah itu, kuning telur yang masih terbungkus oleh membran vitelin, tempatkan pada kertas saring agar semua putih telur yang masih sisa terserap habis. Pecahkan selaput vitelinnya, kemudian masukkan kuning telur kedalam gelas ukur dan siap digunakan sesuai yang dibutuhkan.

Penyiapan ekstrak etanol daun kelor (EEDK) yaitu: timbang 260 gram serbuk daun kelor lalu dimaserasi dengan satu liter etanol 70% selama 12 jam. Setelah 12 jam maserasi, disaring dan ditampung filtratnya. Lalu filtrat yang diperoleh evaporasi menggunakan evaporator dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak semi solid. Kemudian EEDK dikemas dan siap digunakan sesuai dengan yang dibutuhkan.

Pembuatan pengencer susu kacang kedelai sangrai (SKKS) yaitu: pilih kacang kedelai yang berkualitas baik, kemudian kacang kedelai yang sudah tersedia disangrai menggunakan api sedang sehingga kacang kedelai berubah warna menjadi kecoklatan. Setelah disangrai, dinginkan kacang kedelai tersebut dan kemudian diblender hingga halus seperti bubuk susu kacang kedelai. Susu kacang kedelai sangrai (SKKS) yang sudah tersedia ditimbang sebanyak 7 gram, masukkan kedalam mortal dan haluskan lagi menjadi benar-benar bubuk, lalu larutkan dengan 100 mL aquades, setelah itu larutan tersebut disentrifus. Larutan disertifus dengan kecepatan 3,000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terpisah diambil lalu diisi dalam gelas ukur. Selanjutnya, ambilkan pengencer SKKS 80 mL dan tambahkan 20 mL kuning telur (KT), homogenkan menggunakan stirrer yang dilengkapi spin bar hingga tercampur merata. Lalu, tambahkan antibiotik penicillin 1.000 IU/mL serta streptomycin 1.000 mg/mL dan dihomogenkan kembali menggunakan stirrer. Kemudian, tambahkan 1% ekstrak etanol daun kelor (EEDK).

Pembuatan pengencer sitrat (S) yaitu: timbang bubuk sitrat sebanyak 2,9 gram dan dilarutkan dalam 100 mL aquades. Ambilkan pengencer sitrat 80 mL, masukkan ke dalam gelas ukur lalu tambahkan 20 mL KT, homogenkan menggunakan stirrer dan spin bar hingga tercampur merata. Lalu, tambahkan antibiotik penicillin 1.000 IU/mL serta streptomycin 1.000 mg/mL dan dihomogenkan kembali menggunakan stirrer. Kemudian, tambahkan EEDK 1%. Setelah pembuatan pengencer selesai, maka pengencer siap digunakan.

### Penampungan Semen

Ternak yang digunakan sebagai sumber semen dalam penelitian ini adalah 1 ekor babi jantan landrace yang berumur 2 tahun, yang berada dalam kondisi sehat, tubuh yang proporsional, mempunyai organ reproduksi normal dan telah terlatih untuk ditampung semennya. Tabung yang telah disiapkan untuk penampungan, pada bagian permukaannya sudah dilapisi dengan kain kasa lalu diikat dengan tujuan agar semen tidak tercampur dengan gelatin. Penampungan semen ini dilakukan secara manual. Ketika babi jantan telah menaiki betina buatan (dummy), segera menggenggam ujung penis dengan tangan, tarik perlahan-lahan dan lakukan pemijatan atau rangsangan pada ujung penis sehingga pejantan dengan cepat mengeluarkan semen. Semen yang diperoleh langsung dibawa ke laboratorium dengan keadaan tidak terkena langsung sinar matahari, untuk dilakukan pemeriksaan atau dilakukan evaluasi.

### Evaluasi Semen

Semen segar yang diperoleh dilakukan pemeriksaan secara makroskopis meliputi: volume, warna, konsistensi/kekentalan dan pH. Sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas, dan abnormalitas.

#### 1. Evaluasi Secara Makroskopis

- a. Volume semen segar dicatat dengan melihat jumlah ejakulat sesuai skala yang didapat pada tabung penampung.

- b. Warna semen segar langsung dilihat pada tabung. Warna normal semen segar putih susu.
- c. Kekentalan atau konsistensi diamati dengan cara memiringkan tabung semen segar lalu tegakkan kembali. Apabila semen yang mengalir pada dinding tabung lambat maka konsistensinya tinggi/kental namun jika sebaliknya maka konsistensinya rendah/encer
- d. Derajat keasaman/pH semen segar diukur dengan menggunakan kertas indikator pH dengan cara dicelupkan kedalam tabung berisi semen segar. Selanjutnya, amati perubahan warna pada kertas indikator dan bandingkan dengan standar warna kertas indikator pH

#### 2. Evaluasi Secara Mikroskopis

- a. Konsentrasi: pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan kamar hitung neubauer. Pipet eritrosit diisi dengan semen segar sampai batas 0,5, kemudian dilarutkan eosin hingga mencapai angka 101, kemudian digerakan dengan membentuk angka delapan. Semen segar yang telah diencerkan tadi ditetaskan diatas hitung neubauer, kemudian diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x40 dengan perhitungan dilakukan pada lima kotak hemocytometer yaitu pada keempat kotak yang ada di tepi dan satu kotak di bagian tengah. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan rumus :  $\text{Spermatozoa} = \text{Jumlah spermatozoa} \times 10 \times 10^6 \text{ sel/mL}$ .
- b. Motilitas spermatozoa : spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran lensa objektif 40x10. Penilaian diberikan mulai 0% (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai

100% (semua spermatozoa bergerak ke depan).

- c. Viabilitas spermatozoa : dihitung dengan melihat jumlah spermatozoa yang hidup dan mati menggunakan media eosin-negrosin. Spermatozoa hidup ditandai dengan spermatozoa tidak menyerap warna merah (bening atau putih), sedangkan spermatozoa mati akan terlihat penyerapan warna merah ungu dari eosin-negrosin. Perhitungan nilai viabilitas diperoleh sesuai rumus:

$$Viabilitas = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{Total spermatozoa yang terhitung}} \times 100\%$$

- d. Abnormalitas spermatozoa : dapat diketahui dengan cara semen segar diwarnai dengan melihat bentuk morfologi spermatozoa yang tidak normal baik abnormalitas primer maupun sekunder. Perhitungan nilai abnormalitas diperoleh sesuai rumus:

$$Abnormalitas = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{Total spermatozoa yang terhitung}} \times 100\%$$

### Pengenceran dan Penyimpanan Semen

Semen segar yang telah dievaluasi, diencerkan dengan bahan pengencer SKKS-KT-EDK dan S-KT-EDK dan dibagi kedalam 5 tabung perlakuan yang sudah disiapkan. Lalu lakukan evaluasi pasca pengenceran terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas dan selanjutnya semen diisi kedalam eppendorf. Kemudian, masukkan dalam plastik dan simpan dalam box styrofoam dengan suhu 18-20°C yang dikontrol dengan termometer dan dilakukan evaluasi setiap delapan jam hingga motilitas 40% sesuai (SNI, 2014).

### Variabel Penelitian

- a. Motilitas spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa melakukan gerak maju atau progresif. Tujuan dilakukannya perhitungan motilitas pada spermatozoa adalah untuk mengamati spermatozoa yang hidup dan mati. Spermatozoa yang tidak bergerak dikategorikan sebagai spermatozoa mati,

sedangkan yang bergerak progresif menunjukkan spermatozoa yang hidup. Motilitas spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40×10.

- b. Viabilitas Spermatozoa : pemeriksaan viabilitas untuk mengetahui spermatozoa hidup dan spermatozoa mati dengan menggunakan larutan eosin-negrosin. Teteskan semen di atas object glass dan campurkan dengan satu tetes eosin-negrosin. Homogenkan campuran kemudian dibuat preparat ulas dan keringkan dengan heating table. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x40. Spermatozoa yang hidup ditandai dengan kepala spermatozoa tidak berwarna, karena spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna. Sedangkan, spermatozoa mati ditandai dengan kepala spermatozoa berwarna merah, karena spermatozoa mati menyerap warna.
- c. Abnormalitas Spermatozoa: persentase abnormalitas dilakukan dengan menggunakan pewarna yang sama dengan viabilitas. Perhitungan dilakukan dengan cara menempatkan preparat hasil pewarnaan diferensial di bawah mikroskop dan amati menggunakan perbesaran lensa 40x10. Abnormalitas dapat terjadi pada bagian kepala ataupun ekor spermatozoa.
- d. Daya tahan hidup spermatozoa ditandai dengan lamanya spermatozoa dapat bertahan hidup setelah pengenceran dan penyimpanan hingga motilitas spermatozoa di bawah 40%.

### Analisis Data

Data yang terkumpul dihitung rata-rata dan standar deviasi dan selanjutnya dianalisis dengan analysis of variance (Anova) dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Analisis menggunakan software SPSS 25.0 of windows.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pengaruh Perlakuan Terhadap Motilitas Spermatozoa

Nilai motilitas dapat dilihat pada Tabel 1

Tabel 1. Pengaruh perlakuan terhadap motilitas spermatozoa

Jam	Perlakuan %					
	P0	P1	P2	P3	P4	P-Value
0	78,00±2,74 <sup>a</sup>	78,00±2,74 <sup>a</sup>	78,00±2,74 <sup>a</sup>	78,00±2,74 <sup>a</sup>	78,00±2,74 <sup>a</sup>	1,00
8	65,00±5,00 <sup>a</sup>	73,00±2,74 <sup>b</sup>	71,00±4,18 <sup>b</sup>	73,00±2,74 <sup>b</sup>	73,00±2,74 <sup>b</sup>	0,00
16	56,00±5,48 <sup>a</sup>	67,00±2,74 <sup>b</sup>	61,00±4,18 <sup>b</sup>	67,60±2,51 <sup>c</sup>	67,00±2,74 <sup>c</sup>	0,00
24	47,00±4,47 <sup>a</sup>	59,00±2,24 <sup>bc</sup>	55,00±3,53 <sup>b</sup>	62,40±2,51 <sup>c</sup>	61,00±4,18 <sup>c</sup>	0,00
32	37,00±4,47 <sup>a</sup>	49,00±2,24 <sup>b</sup>	46,00±4,18 <sup>b</sup>	53,80±2,17 <sup>c</sup>	50,00±3,53 <sup>bc</sup>	0,00
40	28,00±2,74 <sup>a</sup>	41,40±2,19 <sup>bc</sup>	38,40±3,78 <sup>b</sup>	45,80±1,30 <sup>d</sup>	42,60±3,71 <sup>cd</sup>	0,00
48	19,20±3,70 <sup>a</sup>	31,60±3,21 <sup>bc</sup>	27,80±4,66 <sup>b</sup>	36,20±1,64 <sup>c</sup>	33,20±4,09 <sup>c</sup>	0,00

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ). P0 = SKKS-KT 100%, P1 = SKKS-KT 75% + S-KT 25%, P2 = SKKS-KT 50% + S-KT 50%, P3 = SKKS-KT 25% + S-KT 75% dan P4 = S-KT 100%

Dari Tabel di atas terlihat bahwa terjadi penurunan nilai motilitas spermatozoa secara bertahap setiap perlakuan dengan bertambahnya waktu penyimpanan. Persentase motilitas spermatozoa pada jam ke-0 untuk semua perlakuan adalah sama yaitu 78,00±2,74%. Hal ini menunjukkan bahwa belum ada perubahan kualitas spermatozoa selama penyimpanan awal. Secara umum, penurunan motilitas setelah penyimpanan yang lama lebih diakibatkan oleh penurunan zat-zat makanan spermatozoa dan pengaruh zat toksik hasil sampingan dari proses metabolisme spermatozoa.

Hasil analisis statistik terhadap motilitas pasca pengenceran atau pada jam ke-0, persentase motilitas spermatozoa berbeda yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ) antara perlakuan, namun setelah penyimpanan jam ke 8-40 menunjukkan berbeda yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada perlakuan P0, P1, P2, P3 dan P4. Pada penyimpanan jam ke-40 motilitas spermatozoa tertinggi terdapat pada P3 yaitu 45,80±1,30% dan terendah terdapat pada P2 yaitu 38,40±3,78. Persentase motilitas spermatozoa sebesar 45,80±1,30% memenuhi (SNI, 2014) minimal semen untuk IB 40% spermatozoa motil progresif.

Angka pada Tabel 1 memperlihatkan terjadi penurun motilitas dari masing-masing perlakuan seiring dengan bertambahnya umur penyimpanan. Hal ini disebabkan oleh semakin berkurangnya energi yang terdapat

dalam medium pengencer. Secara umum, penurunan motilitas spermatozoa setelah penyimpanan yang lama diakibatkan oleh penurunan zat-zat makanan spermatozoa dan pengaruh zat toksik hasil sampingan dari proses metabolisme spermatozoa. Motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa adenosine triphosphate (ATP) hasil dari proses metabolisme sel. Penurunan motilitas juga dapat disebabkan oleh adanya kejutan dingin dan peningkatan asam laktat.

Tamoes et al. (2014) menyatakan bahwa pengaruh utama dari kejutan dingin terhadap sel spermatozoa adalah penurunan motilitas dan daya hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Suasana asam laktat menyebabkan kerusakan organel-organelnya sehingga metabolisme sebagai upaya untuk memperoleh energi terganggu.

Perlakuan P3 bertahan sampai pada jam ke-40, diduga karena adanya kandungan nutrisi di dalam pengencer yang terdapat pada susu kacang kedelai sangrai (SKKS) 25% dan sitrat 75%. Motilitas yaitu salah satu parameter yang perlu diperhatikan terhadap kualitas spermatozoa yang akan diproses untuk keperluan IB. Dengan kombinasi (SKKS) 25% dan sitrat 75% memberikan perbedaan yang signifikan dalam mempertahankan motilitas selama 40 jam penyimpanan berbeda dengan kombinasi SKKS 50%, 75% dan 100%. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh yang baik setelah kombinasi SKKS 25% + sitrat 75% terhadap motilitas spermatozoa selama 40 jam penyimpanan.

Adiandri et al. (2014) menyatakan bahwa saat konsentrasi susu kacang kedelai dinaikkan maka akan memiliki efek negatif terhadap kualitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa akan menurun ketika konsentrasi lesitin pada pengencer lebih tinggi dan tingginya konsentrasi susu kacang kedelai mengakibatkan banyaknya gumpalan susu kacang kedelai pada medium sehingga berpengaruh pada pergerakan spermatozoa. Sitrat berperan sebagai buffer untuk

mempertahankan pH selama proses penyimpanan pada suhu dingin untuk preservasi daya tahan hidup dan fertilitas spermatozoa, (Garner dan Hafez, 2000).

Standar motilitas yang layak digunakan pada inseminasi buatan yaitu 40% yang terdapat pada setiap perlakuan yang diamati pada jam yang berbeda. Berdasarkan Tabel 1, jika dikaitkan dengan IB maka pada perlakuan P0 digunakan untuk IB pada penyimpanan jam ke 2, perlakuan P2 pada jam ke 32, perlakuan P1, P4 dan P3 pada jam ke 40.

### Pengaruh Perlakuan Terhadap Viabilitas Spermatozoa

Nilai viabilitas spermatozoa dari hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2, terlihat bahwa persentase viabilitas tertinggi terdapat pada P3 setelah penyimpanan 40 jam yaitu  $54,27 \pm 4,71\%$ , diikuti P4, P1, P2 lebih baik dibandingkan dengan perlakuan P1, P2, P4 dan P0. Persentase viabilitas spermatozoa pada perlakuan P3 mampu bertahan sampai jam ke-40 dengan nilai  $54,27 \pm 4,71\%$  lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya, diukur berdasarkan nilai motilitas pada Tabel 1. Hal ini disebabkan oleh kombinasi kedua pengencer yang mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat radikal bebas sehingga dapat mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa yang didukung dengan adanya kandungan lipoprotein dan fosfolipid dalam susu kacang kedelai yang dapat melindungi membran plasma spermatozoa. Disisi lain, mungkin spermatozoa telah dapat menyesuaikan dengan bahan pengencer dan suhu penyimpanan untuk melakukan aktivitas metabolisme dengan baik, namun dengan bertambahnya umur spermatozoa selama penyimpanan maka ketersediaan sumber nutrisi mulai berkurang. Penurunan viabilitas tertinggi terdapat pada P2, ini membuktikan bahwa semakin tinggi konsentrasi SKKS yang ditambahkan maka semakin kecil persentase

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap viabilitas spermatozoa

Jam Ke -	Perlakuan %					P-Value
	P0	P1	P2	P3	P4	
0	91,35 $\pm$ 5,74 <sup>a</sup>	91,36 $\pm$ 5,64 <sup>a</sup>	91,36 $\pm$ 5,83 <sup>a</sup>	91,16 $\pm$ 5,57 <sup>a</sup>	51,20 $\pm$ 5,78 <sup>a</sup>	1,00
8	67,77 $\pm$ 4,79 <sup>a</sup>	85,64 $\pm$ 6,77 <sup>b</sup>	80,47 $\pm$ 4,49 <sup>ab</sup>	85,90 $\pm$ 5,20 <sup>b</sup>	83,50 $\pm$ 5,68 <sup>ab</sup>	0,07
16	66,82 $\pm$ 8,40 <sup>a</sup>	77,97 $\pm$ 6,88 <sup>b</sup>	72,93 $\pm$ 6,15 <sup>ab</sup>	79,19 $\pm$ 4,48 <sup>b</sup>	74,71 $\pm$ 4,52 <sup>ab</sup>	0,04
24	59,05 $\pm$ 6,90 <sup>a</sup>	71,60 $\pm$ 6,08 <sup>b</sup>	65,15 $\pm$ 5,15 <sup>ab</sup>	71,60 $\pm$ 2,72 <sup>b</sup>	65,45 $\pm$ 5,01 <sup>ab</sup>	0,00
32	50,72 $\pm$ 6,58 <sup>a</sup>	62,81 $\pm$ 6,13 <sup>b</sup>	55,85 $\pm$ 6,66 <sup>ab</sup>	63,34 $\pm$ 4,01 <sup>b</sup>	57,86 $\pm$ 3,75 <sup>ab</sup>	0,00
40	37,91 $\pm$ 6,52 <sup>a</sup>	53,21 $\pm$ 3,87 <sup>b</sup>	48,20 $\pm$ 4,42 <sup>b</sup>	54,27 $\pm$ 4,71 <sup>b</sup>	50,47 $\pm$ 4,10 <sup>b</sup>	0,00
48	30,72 $\pm$ 3,53 <sup>a</sup>	42,16 $\pm$ 3,53 <sup>c</sup>	37,48 $\pm$ 2,77 <sup>b</sup>	43,87 $\pm$ 2,58 <sup>c</sup>	41,13 $\pm$ 3,78 <sup>bc</sup>	0,00

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). P0 = SKKS-KT 100%, P1 = SKKS-KT 75% + S-KT 25%, P2 = SKKS-KT 50% + S-KT 50%, P3 = SKKS-KT 25% + S-KT 75%, dan P4 = S-KT 100%.

hidup spermatozoa babi landrace karena konsentrasi SKKS yang tinggi dapat mempengaruhi ruang gerak spermatozoa.

Hasil analisis statistik terhadap viabilitas spermatozoa setelah pengenceran menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ) antara perlakuan, namun setelah penyimpanan selama 8-40 jam menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). Semakin lama spermatozoa disimpan, maka dapat menurunkan jumlah spermatozoa pada setiap perlakuan, akibat spermatozoa mati secara alami. Penurunan viabilitas spermatozoa juga dapat disebabkan oleh stres oksidatif yang dialami oleh spermatozoa selama penyimpanan pada suhu dingin. Hal ini sependapat dengan (Susilawati, 2011), bahwa proses pendinginan mengakibatkan stres fisik dan kimia pada membran sel yang dapat menurunkan viabilitas spermatozoa.

Nilai viabilitas berhubungan dengan kemampuan fertilitas spermatozoa, jika nilai viabilitas tinggi maka nilai kemampuan fertilitas akan tinggi (Blegur et al., 2020). Viabilitas spermatozoa sangat dipengaruhi oleh nutrisi yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama penyimpanan. Nutrisi akan digunakan oleh spermatozoa untuk dijadikan energi sehingga apabila kebutuhan nutrisi berkurang dapat mengakibatkan viabilitas spermatozoa menurun (Hidayaturrahmah, 2018). Hal ini sesuai dengan laporan (Mittal et al., 2010) yang menyatakan bahwa kematian sel spermatozoa atau apoptosis yang akan terjadi jika tidak terdapatnya pelindung antioksidan.

Spermatozoa tidak hidup menyerap warna sedangkan spermatozoa yang menyerap yang mati akan menyerap zat warna (warna

merah). Hal ini disebabkan karena membran secara fisik dan fungsional masih utuh. Eosin yang berikatan dengan natrium sitrat akan masuk ke dalam sel, tetapi karena membran plasma sel masih berfungsi, maka senyawa natrium sitrat dan eosin akan segera dikeluarkan kembali dari dalam sel melalui mekanisme kerja pompa sodium. Pada spermatozoa yang mati, membran plasma spermatozoa termasuk pompa sodium sudah rusak, sehingga senyawa natrium dan eosin yang masuk ke dalam sel tidak lagi dipompa keluar dan tetap bertahan dalam sel, hal ini yang mengakibatkan kepala spermatozoa berwarna merah.

### Pengaruh Perlakuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Nilai abnormalitas spermatozoa dari hasil penelitian ini dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap abnormalitas spermatozoa

Jam Ke-	Perlakuan %					P-Value
	P0	P1	P2	P3	P4	
0	4,50±0,61 <sup>a</sup>	4,36±0,55 <sup>a</sup>	4,49±0,44 <sup>a</sup>	4,47±0,55 <sup>a</sup>	4,43±0,66 <sup>a</sup>	0,99
8	4,74±0,54 <sup>a</sup>	4,57±0,59 <sup>a</sup>	4,71±0,48 <sup>a</sup>	4,62±0,50 <sup>a</sup>	4,64±0,59 <sup>a</sup>	0,98
16	5,04±0,44 <sup>a</sup>	4,77±0,55 <sup>a</sup>	4,94±0,44 <sup>a</sup>	4,79±0,53 <sup>a</sup>	4,90±0,53 <sup>a</sup>	0,93
24	5,33±0,36 <sup>a</sup>	5,01±0,52 <sup>a</sup>	5,22±0,44 <sup>a</sup>	5,17±0,60 <sup>a</sup>	5,31±0,54 <sup>a</sup>	0,86
32	5,68±0,34 <sup>a</sup>	5,30±0,45 <sup>a</sup>	5,47±0,34 <sup>a</sup>	5,57±0,55 <sup>a</sup>	5,48±0,50 <sup>a</sup>	0,73
40	5,97±0,27 <sup>a</sup>	5,65±0,42 <sup>a</sup>	5,76±0,31 <sup>a</sup>	5,86±0,51 <sup>a</sup>	5,92±0,38 <sup>a</sup>	0,70
48	6,38±0,22 <sup>a</sup>	6,02±0,37 <sup>a</sup>	6,14±0,20 <sup>a</sup>	6,26±0,47 <sup>a</sup>	6,27±0,28 <sup>a</sup>	0,47

Superskrup yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05). P0= SKKS-KT 100%, P1= SKKS-KT 75% + S-KT 25%, P2= SKKS-KT 50% + S-KT 50%, P3= SKKS-KT 25% + S-KT 75% dan P4= S-KT 100%.

S-KT 25%, P2= SKKS-KT 50% + S-KT 50%, P3= SKKS-KT 25% + S-KT 75% dan P4= S-KT 100%.

Hasil penelitian terhadap variabel abnormalitas menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05) sejak jam ke-0 sampai jam ke-40 penyimpanan. Hal ini dapat disebabkan oleh adanya penambahan susu kacang kedelai yang memiliki kandungan lesitin sebagai anti cold shock yang mampu mempertahankan bentuk normal spermatozoa. Pamungkas dan Anwar (2013) menyatakan bahwa anti cold shock perlu ditambahkan agar dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu. Anti cold shock ini terdapat pada kuning telur (lesitin hewani) dan kacang kedelai (lesitin nabati).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kombinasi susu kacang kedelai dan pengencer sitrat tidak memberikan dampak negatif terhadap abnormalitas spermatozoa babi

landrace. Hasil ini masih sangat baik jika dibandingkan dengan beberapa penelitian (Johnson et al., 2000b) menyatakan bahwa persentase abnormalitas babi tidak boleh melebihi 20%.

Menurut Solihati et al. (2008) menyatakan bahwa abnormalitas dapat terjadi karena kejutan suhu dingin dan ketidak seimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama penyimpanan pada suhu rendah. Selanjutnya, menurut Suyadi dan Iswanto, (2012) bahwa peningkatan angka abnormalitas spermatozoa dapat terjadi saat pembuatan preparat. Semakin lama umur penyimpanan maka semakin tinggi nilai abnormalitas spermatozoa, hal ini disebabkan oleh spermatozoa yang dingin dan juga tidak seimbangan tekanan osmotik dalam proses metabolisme berlangsung. Kerusakan membran terjadi pada bagian tengah/midpiece spermatozoa, pada bagian tengah ini terdapat mitokondria yang terlibat dalam pembentukan energi, oksidasi asam lemak dan siklus krebs. Stres oksidatif selama penyimpanan dapat menyebabkan pembentukan peroksidasi lipid yang selanjutnya mengakibatkan kerusakan membran sel.

### Pengaruh Perlakuan Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Tabel 5. Pengaruh perlakuan terhadap daya tahan hidup spermatozoa

Perlakuan	Daya Tahan Hidup (Jam)
P0	28,80±4,38 <sup>a</sup>
P1	40,00±0,00 <sup>c</sup>
P2	35,20±4,38 <sup>b</sup>
P3	40,00±0,00 <sup>c</sup>
P4	40,00±0,00 <sup>c</sup>
P-Value	0,00

Superskrup yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05). P0= SKKS-KT 100%, P1= SKKS-KT 75% + S-KT 25%, P2= SKKS-KT 50% + S-KT 50%, P3= SKKS-KT 25% + S-KT 75% dan P4= S-KT 100%.

Daya tahan hidup spermatozoa babi landrace pada hasil penelitian terlihat ini pada Tabel 5.

Tabel 5 menunjukkan spermatozoa yang dipreservasi dalam pengencer kombinasi SKKS-KT+S-KT pada perlakuan P1, P3 dan P4 memiliki daya tahan hidup yang lebih lama dengan persentase yang sama yaitu 40,00±0,00 % selama 40 jam penyimpanan. Dengan ini, memperlihatkan bahwa begitu pentingnya pengencer yang mengandung



suplemen nutrisi dalam memperpanjang kehidupan spermatozoa in vitro. Penambahan susu kacang kedelai sangrai dalam pengencer sitrat terbukti dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada perlakuan berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap daya tahan hidup spermatozoa. Perlakuan P1, P3 dan P4 menunjukkan daya tahan hidup secara nyata yang lebih lama dalam mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa dibandingkan dengan perlakuan P2 yang kedua pengencer memiliki dosis yang sama yaitu 50 % yang memiliki daya tahan hidup lebih rendah. Daya hidup berhubungan erat dengan nilai motilitas. Jika nilai motilitas tinggi maka daya tahan hidupnya juga tinggi demikian juga sebaliknya nilai motilitas rendah maka daya tahan hidupnya rendah.

Rendahnya daya tahan hidup pada perlakuan P2 juga diduga karena mengalami kerusakan oksidatif akibat pemberian pengencer dengan level yang sama. Menurut (Sugiarto et al., 2014) bahwa daya hidup spermatozoa tergantung pada keutuhan membran spermatozoa, kerusakan membran spermatozoa akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme intraseluler sehingga spermatozoa akan melemah dan bahkan dapat mengalami kematian.

## SIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu kombinasi pengencer SKKS-KT 25% dan pengencer S-KT 75% merupakan perlakuan terbaik dalam mempertahankan kualitas semen babi landrace selama 40 jam penyimpanan.

## SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji keberhasilan IB menggunakan semen segar yang diencerkan yaitu kombinasi 25% SKKS-KT dan 75% S-KT.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla, E. M.-E., dan Terada, T. 2004. Effects of the Supplementation of Trehalose Extender Containing Egg Yolk With Sodium Dodecyl Sulfate on the Freezability of Goat Spermatozoa. *Theriogenology*, 62(5), 809–818.
- Adiandri, R. S., Hidayah, N., dan Rahayu, E. 2014. Efek Pengolahan terhadap Kandungan Oligosakarida dan Sifat Fisikokimia Tepung Kedelai dan Kacang Hijau. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Tanaman Aneka Kacang Dan Umbi*, 941.
- Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., dan Gilani, A. H. 2007. *Moringa Oleifera: A Food Plant with Multiple Medicinal Uses. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(1), 17–25.
- Bergeron, A., dan Manjunath, P. 2006. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338–1344.
- Blegur, J., Nalley, W. M., dan Hine, T. M. 2020. Pengaruh Penambahan Virgin Coconut Oil Dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Selama Preservasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 7(2), 130–138.
- Fafo, M., Hine, T. M., dan Nalley, W. M. 2016. Pengujian Efektivitas Ekstrak Daun Kelor dalam Pengencer Sitrat-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Babi Landrace. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 3(2), 184–195.
- Feradis, M. P. 2010. *Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak*. Alfabeta. Bandung.
- Garner, D. L., dan Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96–109.
- Hidayaturrahmah, H. 2018. Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa. *Bioscientiae*, 4(1).

- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., dan Maxwell, W. M. C. 2000b. Storage of Boar Semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 143-172.
- Kurniasih, E. 2013. Khasiat dan Manfaat Daun Kelor. Penerbit Pustaka Baru Press: Yogyakarta.
- Mittal, P., Gupta, V., Kaur, G., Garg, A. K., dan Singh, A. 2010. Phytochemistry and Pharmacological Activities of Psidium Guajava. *IJPSR*, 1(9), 9-19.
- Nalley, W. M. M., Handarini, R., Yusuf, T. L., Purwantara, B., dan Semiadi, G. 2011. The Effect of Glycerol Concentration in Tris Glucose Egg Yolk Extender on the Quality of Timor Deer Frozen Semen. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 36(2), 91-96.
- Pamungkas, F. A., dan Anwar. 2013. Daya Tahan Hidup Spermatozoa Kambing Boer dalam Pengencer Tris Kuning Telur yang Disimpan pada Temperature Berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan Dan Veteriner*. Bogor, 4-5.
- Purwoistri, R. F., Susilawati, T., dan Rahayu, S. 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan Cauda Epididymal Plasma-2 Ditambahkan Kuning. *Jurnal Veteriner*, 14(3), 371-378.
- Rahayu, W., dan Marhendra, A. P. W., 2014. Kualitas Semen Segar Kambing Boer pada Temperatur Penyimpanan 4°C dengan Menggunakan Pengencer Sitrat dan Suplementasi Susu Kedelai Bubuk. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 2(1), 55-60.
- Solihati, N., Idi, R., Rasad, S. D., Rizal, M., dan Fitriati, M. 2008. Quality of Cauda Epididymal Spermatozoa of Ongole Crossbred Bull in Skim Milk, Tris, and Citrate Extenders Added with Egg Yolk. *Animal Production*, 10(1): 99-106.
- Sugiarto, N., Susilawati, T., dan Wahyuningsih, S. 2014. Kualitas Semen Cair Sapi Limousin Selama Pendinginan Menggunakan Pengencer CEP-2 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Sari Kedelai. *Journal of Tropical Animal Production*, 15(1), 51-58.
- Susilawati, T. 2011. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan dengan Kualitas dan Deposisi Semen yang Berbeda pada Sapi Peranakan Ongole. *Journal of Tropical Animal Production*, 12(2), 15-24.
- Suyadi, A. R., dan Iswanto, N. 2012. Pengaruh  $\alpha$ -tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethane Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 5°C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan*, 22(3), 1-8.
- Tamoes, J. A., Nalley, W. M., dan Hine, T. M. 2014. Fertilitas Spermatozoa Babi Landrace dalam Pengencer Modifikasi Zorlesco dengan Susu Kacang Kedelai. *Sains Peternakan: Jurnal Penelitian Ilmu Peternakan*, 12(1), 20-30.