

**Pengaruh Penambahan Filtrat Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dalam Pengencer Tris - Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali**

*The Effect of Adding Rosella Flower Petal Filtrate (*Hibiscus Sabdariffa* Linn) to Tris - Egg Yolk Diluent on The Quality of Bali Bull Spermatozoa.*

**Mardan Laes Papituan, Petrus Kune, Kirenus Uly, Wilmientje Marlene Nalley**  
Fakultas Peternakan - Universitas Nusa Cendana Kupang, Jl. Adisucipto, Penfui, Kode Pos 104 Kupang 85001 NTT, Telp (0380)881580. Fax(0380)881674  
Email: [mardanlae@gmail.com](mailto:mardanlae@gmail.com), [ulykirenus@gmail.com](mailto:ulykirenus@gmail.com)

**ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh suplementasi filtrat rosella (FR) dalam pengencer tris kuning telur (T-KT) terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa sapi bali selama penyimpanan. Materi yang digunakan adalah semen segar sapi bali yang berkualitas baik. Semen diencerkan dengan pengencer perlakuan yaitu : P0: T-KT – 0% , P1: T-KT – 1% FR, P2: T-KT – 2% FR, P3: T-KT – 3% FR, P4: T-KT – 4% FR dan P5: T-KT – 5% FR. Setelah pengenceran semen disimpan pada suhu 3-5° C. Semen di evaluasi pasca pengenceran dan setiap 24 jam penyimpanan terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplemenasi filtrat rosella pada perlakuan (P3) mempunyai kualitas terbaik ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan perlakuan lainnya, yaitu dengan motilitas ( $48,05 \pm 1,54\%$ ), viabilitas ( $56,21 \pm 0,93\%$ ), dan abnormalitas ( $4,13 \pm 0,45\%$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suplementasi filtrat rosella 3% dalam pengencer Tris- kuning telur memberikan pengaruh yang cukup baik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi bali.

Kata kunci: Tris- kuning telur, filtrat rosella (FR), spermatozoa, sapi bali.

**ABSTRACT**

The purpose of this research is to know the effect of roselle filtrate (RF) supplementation in tris-egg yolk diluent (T-EY) on motilities, viabilities, and abnormalities of Bali bull spermatozoa during storage. The material used is fresh cement from good quality of Bali bull. cement was diluted with a treatment diluent, namely: T0: T-EY - 0%, T1: T-EY - 1% RF, P2: T-EY - 2% RF, T3: T-EY - 3% RF, P4: T-EY - 4% RF and P5: T-EY - 5% RF. After dilution cement was stored at 3-5° C. The cement was evaluated post-dilution and every 24 hours storage for motilities, viabilities and abnormalities. The results showed that roselle filtrate supplementation in the (T3) treatment had the best quality ( $P < 0.05$ ) compared to other treatments, namely motilities  $48.05 \pm 1.54\%$ , viabilities  $56.21 \pm 0.93\%$ , and abnormalities  $4.13 \pm 0.45\%$ . The results of this research showed that 3% roselle filtrate supplementation in Tris- egg yolk diluent had a good effect in maintaining the quality of Bali bull spermatozoa.

Keywords: Tris- egg yolk, roselle filtrate (RF), sperm, bali bull.

## PENDAHULUAN

Proses 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. Menurut Ari dkk. (2011), pengencer yang umumnya digunakan adalah Tris - kuning telur, karena pengencer tersebut mengandung nutrisi untuk spermatozoa berupa lipoprotein dan fosfolipid seperti fosfatidikolin yang melindungi dan mencegah kerusakan pada membran spermatozoa akibat *cold shock*, dan bersifat buffer.

Pengencer yang sering digunakan dalam pengenceran semen yaitu pengencer Tris- kuning telur. Dalam pengencer tersebut terdapat Tris amino methane, asam sitrat, raffinosa dan kuning telur (Mardiyah, 2001). penyangga tersebut berfungsi untuk mempertahankan pH semen dari adanya kejutan dingin (Widjaya, 2011). Terdapat pula laktosa yang berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa yang akan dimetabolisme pada proses glikolisis untuk menghasilkan ATP sehingga spermatozoa dapat bergerak dan mempertahankan hidupnya (Rizal dkk., 2006). Kuning telur merupakan bagian dari telur yang memiliki kandungan gizi yang tinggi. Kuning telur mengandung glukosa dan beberapa jenis protein serta vitamin yang larut dalam air maupun minyak yang memiliki viskositas yang baik bagi spermatozoa (Hardijanto dkk., 2010).

Namun dalam pengolahannya, semen banyak berhubungan dengan

udara luar yang mengandung oksigen. Hal ini dapat menyebabkan rusaknya membrane plasma sel spermatozoa. Penyebab kerusakan dari membran plasma disebabkan karena terbentuknya radikal bebas yang merupakan produk dari metabolisme spermatozoa tersebut. Reaksi antara radikal bebas dan lipid terutama asam lemak tak jenuh yang dominan menyusun membran plasma sel akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipida. Reaksi awal ini akan terjadi terus menerus (autokatalitik) (Suryohudoyo, 2000) dan pada akhirnya dapat merusak sebagian besar atau seluruh membran plasma sel spermatozoa.

Untuk meminimalkan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas, di dalam pengenceran semen perlu ditambahkan senyawa antioksidan. Dalam Kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa linn* mengandung beberapa komponen antioksidan antara lain alkaloid, eugenol, sterol, asam sitrat, vitamin C, asam tartarat, pektin, dan polifenol. Senyawa yang bersifat antioksidan antara lain polifenol yang berupa asam fenolik dan flavonoid (Ali dkk., 2005; Hirunpanich dkk., 2005; Mahadevan dkk., 2009). Selain itu, vitamin C dan  $\beta$ -carotene dalam kelopak bunga rosella juga bersifat sebagai antioksidan (Ali dkk., 2005).

Setyaningsih (2011), dalam penelitiannya tentang pengaruh pemberian infuse simplisia rosella secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L.*) jantan galur, dimana kelompok perlakuan (KP1, KP2, KP3) diberi infuse simplisia rosella secara oral

dengan dosis 1,5%; 3%; dan 6% selama 14 hari berturut-turut serta induksi etanol pada hari ke 8-14 secara intraperitoneal menggunakan uji anova 1-faktor ( $P < 0,05$ ) menunjukkan bahwa pemberian infus simplisa rosella dapat meningkatkan motilitas dan menurunkan abnormalitas pada semua kelompok perlakuan. Dari uraian diatas maka telah dilakukan penelitian dengan judul “pengaruh penambahan filtrat kelopak bunga rosella dalam pengencer Tris - kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi bali”.

## MATERI DAN METODE PENELITIAN

### Materi Penelitian

Penelitian menggunakan semen segar yang diperoleh dari ternak sapi bali jantan umur 3- 4 tahun. Bahan pengencer semen cair yaitu tris, kuning telur ayam kampung, filtrat kelopak bunga rosella, bahan pewarnaan spermatozoa (eosin-negrosin), aquades, alkohol 70% serta antibiotic (*penisillin dan streptomisin*). Peralatan laboratorium yang digunakan yaitu seperangkat alat penampungan semen dan seperangkat alat pemeriksaan kualitas spermatozoa.

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian penelitian adalah : (1) Satu paket alat penampungan semen, (2) Satu paket alat timbangan bahan terdiri dari: timbangan, spatula, aluminium foil, tabung elemeyer, tabung perlakuan, pipet, tabung ukur, dan kertas label, (3) Satu paket alat pengencer semen terdiri dari: gelas piala, gelas ukur, pipet, kertas saring, pinset, kapas, spoit,

baskom stainless, *stirrer* dan *spin bar*, (4) Satu paket peralatan evaluasi semen terdiri dari: mikroskop, object glass dan cover glass, heating table, kertas pH, *hemacyometer*, pipet, *open doff*, tabung berskala, centrifuge untuk menghitung konsentrasi dan *conthing chamber* lengkap dengan pipet eritrosit, (5) Satu paket alat filtrasi rosella yaitu : blender, saringan, tabung reaksi, dan *centrifuge*.

### Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap, terdiri dari enam perlakuan dan lima ulangan sehingga terbentuk tiga puluh unit percobaan. Adapun perlakuan yang diujicobakan adalah sebagai berikut: P0 = TKT 100 % (kontrol), P1 = TKT 99 % + FR 1 %, P2 = TKT 98 % + FR 2 %, P3 = TKT 97 % + FR 3 %, P4 = TKT 96 % + FR 4 %, P5 = TKT 95 % + FR 5 %.

### Pembuatan Bahan Pengencer

Pembuatan larutan penyangga dilakukan dengan cara mengencerkan 3,634 gr Tris, 0,5 gr fruktosa dan asam sitrat 1,99g ke dalam 100 ml aquades pada gelas erlenmeyer lalu dicampur hingga homogen.

Menyiapkan kuning telur yaitu telur ayam kampung yang baik kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. Pecahkan kulit telur dibagian lancipnya kemudian tuangkan semua putih telur dan pisahkan dari kuning telur. Setelah itu pisahkan sisa putih telur dengan kuning telur yang masih terbungkus oleh membrane viteline, dengan cara menempatkan pada kertas

saring agar semua putih telur terserap habis. Pecahkan selaput vitelinnya, kemudian masukan kuning telur kedalam gelas ukur dan siap digunakan sesuai yang di butuhkan.

Pembuatan filtrat rosella yaitu : memilih kelopak rosella dipilih yang baik, bentuknya masih utuh dan warnanya merah. Kemudian kelopak rosella di keringkan menggunakan oven selama 24 jam dengan suhu 150° c. Kelopak rosella yang telah di keringkan kemudian diblender hingga halus. Timbang 100 mg kelopak bunga rosella menggunakan timbangan elektrik kemudian dimasukan kedalam gelas penampung dan dilarutkan dengan 15 ml aquabides. Setelah itu larutan tersebut dicentrifuge dengan kecepatan 3,000 rpm selama 10 menit, untuk mendapatkan filtratnya. Supernatan yang terpisah diambil dan merupakan FR yang siap digunakan.

Pembuatan pengencer dasar menggunakan 80 mL pengencer Tris dan tambahkan 20 mL kuning telur, homogenkan hingga tercampur menggunakan stirer, selanjutnya tambahkan antibiotic dan FR sesuai perlakuan, dari setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali dengan konsentrasi T-KT dan FR yaitu: P0 = T-KT 100% + FR 0%, P1 = T-KT 99% + FR 1%, P2 = T-KT 98% + FR 2%, P3 = T-KT 97% + FR 3%, P4 = T-KT 96% + FR 4%, P5 = T-KT 95% + FR 5%.

### **Penampungan semen**

Alat-alat yang digunakan: (1) Vagina buatan, (2) Tabung penampung semen, (3) Corong, (4) Thermometer (5) Termos yang berisi air panas, (6)

Gelas plastic tempat penampung air dingin. Bahan-bahan yang digunakan: (1) Karet gelang untuk mengikat corong dengan tabung, (2) Gell/vaselin/pelicin, dan (3)Tisu.

Sebelum melakukan penampungan dengan vagina buatan terlebih dahulu menyiapkan air panas bersuhu 50-55°C, kemudian masukan air panas pada klep divagina buatan sampai  $\frac{3}{4}$  bagian dan tutup klepnya. Setelah itu masukan udara dengan cara meniup pada klep bagian atas lalu tutup klep. Beri pelicin 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 tisu 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 sapi jantan menaiki sapi betina arahkan 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 di tabung penampung. Semen yang diperoleh langsung dibawah ke laboratorium untuk dievaluasi.

### Evaluasi semen.

Alat yang perlu disiapkan: mikroskop, object glass dan cover glass, *heating table*, kertas pH, haemocytometer, pipet, ependorf, tabung berskala. Semen yang diperoleh dilakukan pemeriksaan secara makroskopis meliputi: a) Warna semen: dapat dilihat langsung dari gelas ukur saat penampungan spermatozoa, dilakukan, pada umumnya spermatozoa berwarna putih susu. b) Volume semen: dapat di ukur dengan melihat angka pada tabung penampungan berskala. c) Konsistensi: dinilai dengan memiringkan tabung yang berisi semen dan mengembalikan pada posisi semula. Konsistensi dapat dinilai berdasarkan kecepatan semen kembali ke dasar tabung penampung, penilaiannya dikategorikan dalam tiga jenis yaitu: encer, sedang dan kental. d) Derajat keasaman/ pH: dapat diketahui dengan cara meneteskan semen diatas kertas indikator dengan skala 1-14. Perubahan warna pada kertas pH tersebut disesuaikan dengan standar warna pada kertas indikator.

Pemeriksaan secara mikroskopis meliputi : a) Presentase gerakan masa spermatozoa: dikategorikan dalam 3 golongan, yaitu pergerakan masa spermatozoa menyerupai awan tebal dan bergerak cepat (+++), pergerakan masa spermatozoa awan tebal dan bergerak agak lambat (++) dan pergerakan masa spermatozoa menyerupai awan tipis dan bergerak lambat (+). b) Konsentrasi spermatozoa : Menunjukkan jumlah sel spermatozoa tiap satuan volume semen dengan cara

diamati dibawah mikroskop dengan pembesaran  $40\times 10$ . Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan *haemocytometer*.

Perhitungan konsentrasi:

Konsentrasi spermatozoa =  $X \times$

$\text{Volume spermatozoa} \times 10^6 \text{ sperma/ml}$  .

$X =$  Jumlah spermatozoa hasil perhitungan. c) Presentase motilitas:

Spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif  $40\times 10$ . Penilaian diberikan mulai nol persen (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai 100% (semua spermatozoa bergerak ke depan).

d) Viabilitas: 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:

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

e) Abnormalitas: dapat diketahui dengan cara semen diwarnai dengan melihat bentuk morfologi spermatozoa yang tidak normal baik abnormalitas primer maupun sekunder.

Abnormalitas =

$\frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100 \%$ .

### Variabel Penelitian

Variabel yang di ukur dalam penelitian ini adalah; Motilitas spermatozoa (%) adalah persentase

spermatozoa yang bergerak progresif pada suatu lapang padang. Penilaiannya yaitu dengan memberikan angka berkisar antara 0-100% dengan skala 5%. Viabilitas spermatozoa (%) : diketahui dengan mengamati preparat hasil pewarnaan differensial (eosin-negrosin) menggunakan mikroskop. Dimana spermatozoa hidup memiliki kepala berwarna putih sedangkan yang mati berwarna merah. Abnormalitas (%): perhitungan dilakukan dengan cara menempatkan preparat hasil pewarnaan differensial di bawah mikroskop dan

amati menggunakan pembesaran lensa 10 x 40, sebanyak kurang lebih 200 sel sperma. Abnormalitas dapat terjadi pada bagian kepala ataupun ekor spermatozoa.

### Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA), dan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Seluruh data dianalisis menggunakan software SPSS 22.0 *for windows*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar Sapi Bali

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi bali

Karakteristik semen	Rerata ± standar deviasi
<b>Makroskopis</b>	
Volume (mL)	5,14 ± 1,12
Warna	Krem
Konsistensi	Sedang
pH	6,52 ± 0,16
<b>Mikroskopis</b>	
Gerakan Massa	++ /+++
Konsentrasi ( x 10 <sup>6</sup> sel/mL)	1540,00 ± 115,32
Motilitas (%)	78,00 ± 2,73
Viabilitas (%)	84,96 ± 3,13
Abnormalitas (%)	2,68 ± 0,63

Volume semen segar yang ditampung dari pejantan sapi bali dalam penelitian adalah dengan kisaran 4 - 6 ml dan rerata volume semen segar yaitu 5,14 ml. Hasil tersebut Sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000) yaitu volume semen sapi bervariasi setiap penampungan berkisar antara 5 - 8 ml per ejakulasi.

Warna semen menentukan kualitas fisik dari semen yang ditampung. Pada Tabel 1 menunjukkan

bahwa warna semen segar sapi bali adalah krem, hal tersebut sesuai dengan pendapat Feradis (2010) yang menyatakan bahwa semen sapi normal berwarna seperti putih susu atau krem, keputih-putihan dan keruh.

Konsistensi semen segar yang diperoleh termasuk dalam kategori sedang. Aerens *dkk.* (2012) menyatakan bahwa hasil pemeriksaan konsistensi semen segar yang dilakukannya mempunyai persentase yang bervariasi

antar bangsa.

Konsentrasi sperma dalam penelitian ini sebanyak  $1540,00 \pm 115,32$  juta/ml. Hasil sesuai dengan hasil penelitian Ismaya (2014) yang menjelaskan bahwa ketika konsistensinya sedang hingga kental atau warna krem maka konsentrasi spermatozoa berkisar 1.000-2.000 juta spermatozoa/ml.

Derajat keasaman (pH) semen sapi bali hasil penelitian yaitu  $6,52 \pm 0,16$ , hasil ini sesuai dengan laporan Butar (2009) bahwa pH semen segar adalah 6,4-7,8. Namun pH semen segar dapat berbeda – beda di setiap bangsa sapi, Feradis (2010).

Gerakan massa sperma sapi bali yang diperoleh memiliki nilai ++/+++. Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian Arifiantini *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa gerakan massa pada sapi lokal lainnya seperti sapi bali diperoleh rata-rata sebesar 2,7 setara dengan (++) yang disebabkan karena kondisi ternak maupun lingkungan.

Motilitas adalah daya gerak

spermatozoa yang dapat dijadikan sebagai acuan dalam penilaian kualitas spermatozoa untuk inseminasi buatan (Bintara, 2011). Motilitas spermatozoa sapi bali adalah  $78,00 \pm 2,73$  %. Garner and Hafez (2000) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa sapi berkisar antara 40-75%, syarat semen yang diencerkan atau semen beku harus memiliki motilitas spermatozoa minimal 70%.

Viabilitas spermatozoa semen segar sapi yang diperoleh dalam penelitian adalah  $84,96 \pm 3,13$  %, hasil ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Rizal (2009), yang melaporkan bahwa viabilitas spermatozoa sapi bali sebesar 86,75%, (Labetubun, *dkk.*, 2011) 86,75% dan (Siahaan, *dkk.*, 2012) 85%.

Abnormalitas spermatozoa yang diperoleh dalam penelitian ini rata-rata  $2,68 \pm 0,63$ %. Menurut Campbell *dkk.* (2003), Semen yang berkualitas baik memiliki maksimal 15% spermatozoa abnormal. Pendapat ini diperkuat dengan Semen pernyataan Garner dan Hafez (2000) dimana abnormalitas spermatozoa tidak boleh melebihi 20%

### Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Tabel 2. Pengaruh Perlakuan Terhadap Motilitas Spermatozoa

Perlakuan	Hari ke-				
	H0	H1	H2	H3	H4
P0	$78.24 \pm 2.53^a$	$68.39 \pm 2.52^a$	$58.48 \pm 1.76^b$	$47.32 \pm 2.42^b$	$37.11 \pm 1.46^b$
P1	$78.35 \pm 2.44^a$	$70.45 \pm 3.57^b$	$59.15 \pm 1.57^b$	$48 \pm 2.10^b$	$39.38 \pm 0.72^b$
P2	$78.39 \pm 2.63^a$	$69.62 \pm 2.85^{ab}$	$59.93 \pm 1.74^b$	$49.76 \pm 2.29^b$	$40.24 \pm 1^b$
P3	$78.69 \pm 2.59^a$	$73.20 \pm 2.42^a$	$65.74 \pm 1.21^a$	$56.16 \pm 2.57^a$	$48.05 \pm 1.54^a$
P4	$78.58 \pm 2.70^a$	$67.53 \pm 2.39^{bc}$	$57.99 \pm 1.50^b$	$48.78 \pm 5.98^b$	$39.04 \pm 3.81^b$
P5	$78.64 \pm 2.64^a$	$64.32 \pm 2.38^c$	$52.28 \pm 3.86^c$	$40.75 \pm 6.78^c$	$31.79 \pm 2.97^c$

<sup>a,b,c,d</sup> superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P<0,05$ )

Dari Tabel diatas dapat terlihat bahwa terjadi penurunan nilai motilitas spermatozoa secara bertahap di setiap pengujian dengan nilai yang berbeda di tiap perlakuan. Rataan penurunan motilitas yaitu : P0: 10,28%, P1: 9,74%, P2: 9,53%, P3: 7,67%, P4: 9,88% dan P5:11,71%, dengan penurunan motilitas terendah terdapat pada P3: 7,67% dan tertinggi terdapat pada perlakuan P5: 11,71%. Pada perlakuan kontrol (P0), P1, P4, dan P5 mampu mempertahankan persentase spermatozoa hidup  $\geq 40\%$  hingga 3 hari penyimpanan, sedangkan pada perlakuan P2 dan P3 mampu mempertahankan persentase spermatozoa hidup  $\geq 40\%$  selama 4 hari penyimpanan.

Hasil terbaik dalam penelitian ini didapatkan pada perlakuan P3 dengan motilitas  $48.05 \pm 1.54\%$  selama 4 hari penyimpanan dibandingkan dengan kontrol TKT dengan motilitas  $37.11 \pm 1.46\%$  selama 4 hari penyimpanan, hal ini dapat terjadi karena TR memiliki sifat antioksidan yang dapat memberikan elektronnya kepada senyawa radikal bebas sehingga memperbaiki kerusakan oksidatif dari radikal bebas dan memperlambat reaksi oksidasi (Winarsi 2007). Hal ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Sabile *dkk.*, (2016) yang melaporkan presentase motilitas spermatozoa pada sapi bali yang diberikan ekstrak buah mengkudu yang mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sebesar 45,12 % dalam penyimpanan hari ke-4.

Penambahan FR di dalam pengencer T - KT mampu mempertahankan spermatozoa selama empat hari penyimpanan lebih lama dibandingkan dengan pengencer kontrol. Pada perlakuan P3 memiliki persentase motilitas spermatozoa 48.05% pada hari ke-4 lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol 37.11% hari ke-4.

Hasil analisis statistik terhadap motilitas pasca pengenceran menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan ( $P<0,05$ ). Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan FR memberikan respon yang baik terhadap spermatozoa, hal tersebut dikarenakan FR mengandung senyawa yang bersifat sebagai antioksidan sehingga mengurangi kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas, senyawa tersebut adalah polifenol. Senyawa polifenol dikelompokkan berdasarkan jumlah cincin fenol dan gugus senyawa yang terikat pada cincin fenol tersebut (Manach *dkk.*, 2004), salah satu senyawa yang tergolong polifenol adalah flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan senyawa yang banyak terdapat dalam berbagai buah dan sayuran (Nijveldt 2001). Flavonoid mampu menangkap (scavenging) radikal bebas karena memiliki gugus hidroksil pada cincin B (Heim *dkk.*, 2002), sehingga flavonoid dapat berikatan hydrogen (bersifat polar) dengan kepala lipid pada membran sel. Kemampuan tersebut membuat flavonoid dapat berikatan dengan komponen utama membran sel sehingga dapat



melindungi sel dari serangan radikal bebas yang dapat mengakibatkan kerusakan sel (Oteiza *dkk.*, 2005).

### Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Tabel 3. Pengaruh Perlakuan Terhadap Viabilitas Spermatozoa

Perlakuan	Hari ke-				
	0	1	2	3	4
P0	84.25±3.1 <sup>a</sup>	71.79±2.37 <sup>b</sup>	61.89±1.85 <sup>bc</sup>	50.83±2.57 <sup>bc</sup>	41.96±2.31 <sup>b</sup>
P1	84.27±2.9 <sup>a</sup>	74.00±2.43 <sup>b</sup>	63.38±1.58 <sup>b</sup>	52.63±1.98 <sup>bc</sup>	44.36±1.13 <sup>b</sup>
P2	84.24±3.1 <sup>a</sup>	74.66±2.70 <sup>b</sup>	64.91±1.91 <sup>b</sup>	55.10±2.51 <sup>b</sup>	45.32±1.85 <sup>b</sup>
P3	84.34±3.1 <sup>a</sup>	79.69±1.62 <sup>a</sup>	72.70±1.90 <sup>a</sup>	63.06±2.51 <sup>a</sup>	56.21±0.93 <sup>a</sup>
P4	83.89±3.50 <sup>a</sup>	71.19±2.58 <sup>b</sup>	61.72±4.62 <sup>bc</sup>	53.14±5.66 <sup>bc</sup>	44.26±4.18 <sup>b</sup>
P5	84.29±3.31 <sup>a</sup>	70.53±5.61 <sup>b</sup>	58.25±4.04 <sup>c</sup>	47.86±6.27 <sup>c</sup>	37.86±4.8 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> superskrip dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P<0,05$ )

Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa sebagai indikator kualitas spermatozoa (Sukmawati *dkk.*, 2014). Semakin tinggi persentase viabilitas semen maka semakin baik kualitas semen tersebut (Rizal dan Herdis, 2006). Spermatozoa yang hidup memiliki kepala berwarna transparan, hal ini disebabkan karena membran plasma masih utuh dan tidak menyerap warna eosin, sebaliknya pada spermatozoa yang mati menunjukkan kepala berwarna karena menyerap warna eosin. Menurut Susilawati, (2010) persentase viabilitas spermatozoa biasanya lebih tinggi dari persentase motilitas spermatozoa, hal ini dikarenakan terdapat spermatozoa yang motil non-progresif namun spermatozoa tersebut masih hidup sehingga tidak menyerap warna dari larutan eosin

Berdasarkan Tabel 3, rata-rata persentase viabilitas spermatozoa secara bertahap mengalami penurunan yang

berbeda di tiap perlakuan. Rataan penurunan viabilitas yaitu: P0: 10,57%, P1: 9,97%, P2: 9,73%, P3: 7,03%, P4: 9,91% dan P5: 11,61%, penurunan motilitas terendah terdapat pada P3: 7,03% dan tertinggi terdapat pada perlakuan P5: 11,61%. Pada perlakuan kontrol (P0), P1, P2 dan P4 mampu mempertahankan persentase spermatozoa hidup  $\geq 50\%$  selama 3 hari penyimpanan, sedangkan pada perlakuan P5 hanya selama 2 hari penyimpanan dan pada perlakuan P3 hingga 4 hari penyimpanan.

Hasil analisis statistik terhadap viabilitas spermatozoa pasca pengenceran menunjukkan perbedaan yang nyata antara perlakuan ( $P<0,05$ ), yaitu dengan rerata  $56.21\pm 0.93\%$  pada hari ke-4 lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Hal dapat terjadi karena tersedianya antioksidan yang cukup dalam pengencer, sehingga dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa.

Senyawa antioksidan yang diduga berperan dalam mempertahankan kualitas spermatozoa adalah asam askorbat. Asam askorbat (vitamin C) merupakan antioksidan larut dalam air yang mampu mereduksi radikal bebas dalam membran sel sehingga meminimalisasi kerusakan sel yang terjadi dalam kondisi stres oksidatif atau oxidative stress (OS) (Winarsi 2007). Hal tersebut didukung dengan adanya vitamin C yang dapat bersifat sebagai donor atom hidrogen dan bekerja secara sinergis dengan vitamin E dalam memperbaiki kerusakan membran sel (Buettner 1993). Vitamin C dan vitamin E juga berperan dalam meningkatkan laju fruktolisis dalam memenuhi kebutuhan energi spermatozoa. Vitamin C merupakan salah satu antioksidan yang dapat menagkal senyawa radikal bebas dan mengatasi terbentuknya degradasi oksidatif lipid sehingga tidak mengganggu viabilitas dan terjadinya glikolisis.

Senyawa lain dalam FR yang bersifat antioksidan dan turut membantu dalam perbaikan kualitas spermatozoa adalah  $\beta$ -karoten. Senyawa  $\beta$ -karoten mampu meredam (quenching) ROS dan mengurangi peroksidasi lipid pada spermatozoa (Sikka *dkk.*, 1996). Hal tersebut dikarenakan  $\beta$ -karoten adalah senyawa antioksidan yang larut dalam lemak dan mampu memotong reaksi berantai yang terjadi pada peroksidasi lipid pada membran plasma sel yang berasal dari radikal bebas Suryohudoyo (2000) dan Siahaan *dkk.*, (2012).

Viabilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kebutuhan akan nutrisi, nutrisi akan digunakan oleh spermatozoa untuk dijadikan energi sehingga apabila kebutuhan nutrisi spermatozoa berkurang maka akan

mengakibatkan viabilitas spermatozoa menurun (Hidayahturrahmah 2007). Kematian sel spermatozoa (apoptosis) dapat terjadi apabila tidak ada perlindungan antioksidan (Mittal *et al.*, 2010). Spermatozoa yang mati, permeabilitas membran selnya meningkat. Terutama pada daerah *post nuclear caps* sehingga sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna eosin-negrosin, sel spermatozoa yang hidup mempunyai kondisi membran yang baik sehingga zat warna kesulitan menembus membran, akibatnya sel spermatozoa tetap berwarna jernih (Hardijanto *dkk.*, 2010).

Selama pengamatan terjadi penurunan viabilitas di setiap perlakuan, kecepatan penurunan viabilitas dari tiap-tiap perlakuan berbeda. Hal ini dapat terjadi karena berbagai faktor misalnya secara alamiah sel akan mengalami kematian, sperma mengalami stres pada waktu pengenceran dan sperma segar mengalami penurunan kualitas dan jumlah sperma mati lebih banyak setelah penyimpanan selama penyimpanan terjadi (Yani *et al.*, 2001).

Pada parameter viabilitas spermatozoa, hasil penelitian menunjukkan terjadi penurunan viabilitas yang signifikan pada perlakuan P5%. Hal tersebut menunjukkan penambahan FR sebesar 5 % merupakan dosis yang sudah dapat menyebabkan toksik, hal ini di dukung oleh pendapat Savitri *et al.* (2014) yang mengatakan bahwa pemberian antioksidan dalam jumlah banyak dapat memengaruhi laju oksidasi yang mengakibatkan hilangnya aktivitas antioksidan serta antioksidan tersebut

bisa menjadi prooksidan yang dapat menyebabkan overdosis.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Tabel 4. Pengaruh Perlakuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Perlakuan	Hari ke-				
	0	1	2	3	4
P0	2.89±0.64 <sup>a</sup>	3.06±0.63 <sup>a</sup>	3.89±0.58 <sup>abc</sup>	4.24±0.33 <sup>bc</sup>	4.56±0.33 <sup>b</sup>
P1	2.81±0.56 <sup>a</sup>	2.97±0.56 <sup>a</sup>	3.39±0.43 <sup>c</sup>	3.99±0.52 <sup>bc</sup>	4.25±0.49 <sup>b</sup>
P2	2.78±0.44 <sup>a</sup>	3.02±0.54 <sup>a</sup>	3.47±0.32 <sup>bc</sup>	3.82±0.45 <sup>c</sup>	4.16±0.36 <sup>b</sup>
P3	2.69±0.50 <sup>a</sup>	2.91±0.41 <sup>a</sup>	3.39±0.27 <sup>c</sup>	3.84±0.50 <sup>c</sup>	4.13±0.45 <sup>b</sup>
P4	2.78±0.46 <sup>a</sup>	3.02±0.43 <sup>a</sup>	3.94±0.29 <sup>ab</sup>	4.68±0.65 <sup>ab</sup>	5.24±0.44 <sup>a</sup>
P5	2.92±0.50 <sup>a</sup>	3.20±0.63 <sup>a</sup>	4.24±0.28 <sup>a</sup>	5.02±0.53 <sup>a</sup>	5.50±0.38 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> superskrip dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Hasil analisis statistik terhadap abnormalitas pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). Kondisi ini menunjukkan bahwa penambahan FR dalam pengencer Tris kuning telur memberikan pengaruh yang cukup baik terhadap abnormalitas spermatozoa. Pada penelitian ini setiap perlakuan masih menghasilkan persentase abnormalitas spermatozoa dalam kisaran normal yaitu kurang dari 20%. Menurut BSN (2017), abnormalitas kurang dari 20% masih dapat dipakai untuk inseminasi. Persentase abnormalitas ini sedikit berbeda dengan Parera *et al.* (2009) dengan hasil yaitu 9,83%. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh umur dan faktor kesuburan pejantan (Garner & Hafez, 2000).

Nilai abnormalitas semen segar sapi bali yaitu  $2,68 \pm 0,63$  % dan setelah pengenceran  $4,13 \pm 0,45$  %, hal ini disebabkan adanya proses pengenceran dan disimpan pada suhu 5°C diduga meningkat persentase abnormalitasnya

dipengaruhi oleh lipoprotein yang terdapat dalam kuning telur yang semakin lama mediapun semakin menurun fungsi perlingkungannya terhadap spermatozoa melawan dingin. Hal ini sesuai dengan pendapat Kamal *et al.* (2005) dan Arifiantini *et al.* (2006) terjadinya peningkatan abnormalitas spermatozoa disebabkan oleh efek cekaman dingin (*cold shock*) dan ketidakseimbangan nutrisi. Abnormalitas spermatozoa dapat disebabkan oleh pengaruh penurunan pH semen, tekanan osmotik dan stres dingin yang terjadi selama penyimpanan. Sesuai dengan pendapat Solihati *dkk.*, (2008) yang menyatakan bahwa abnormalitas disebabkan karena kejutan suhu dingin dan ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama penyimpanan pada suhu 5°C.

Jenis abnormalitas yang di dapat selama penelitian adalah abnormalitas sekunder, berupa ekor dan kepala terpisah. Ihsan (2011), menyatakan

bahwa pencampuran dengan pengencer dan pembuatan preparat ulas yang kasar dapat menyebabkan kerusakan pada kepala spermatozoa. Susilawati *dkk.*, (2016), menambahkan abnormalitas sekunder terjadi pada saat proses pendinginan atau proses pembekuan dan pada saat preparasi membuat preparat.

### Kesimpulan dan Saran

#### Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suplementasi

filtrat rosella 3% dalam pengencer Tris-kuning telur memberikan pengaruh yang cukup baik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi bali.

#### Saran

Saran untuk penelitian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji keberhasilan dalam pelaksanaan inseminasi buatan menggunakan pengencer Tris - kuning telur yang ditambahkan filtrat kelopak bunga rosella 3%.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aerens, CD, Ishan MN, Isnaini N. 2012. Perbedaan kuantitatif dan kualitatif semen segar pada berbagai bangsa sapi potong. Thesis. Universitas Brawijaya, Malang.
- Ali BH, Wabel NA, Blunden G. 2005. Aspek fitokimia, farmakologis dan toksikologi Hibiscus sabdariffa L .: tinjauan. *Penelitian Fitoterapi: Jurnal Internasional yang Dikhususkan untuk Evaluasi Farmakologis dan Toksikologi dari Turunan Produk Alami* 19 (5): 369-375.
- Ari UC, Kulaksiz R, Öztürkler Y. 2011. Freezability of tushin ram semen extended with goat or cow milk based extenders. *Reproduction in Domestic Animals* 46(6):975-979.
- Arifiantini RI, Ferdian F. 2006. Tinjauan aspek morfologi dan morfometri spermatozoa kerbau rawa (*Bubalus Bubalis*) yang dikoleksi dengan teknik masase. *Jurnal Veteriner* 7(2): 83-91.
- Badan Standarisasi Nasional. 2017. Semen beku-bagian 1: Sapi. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta. SNI 4869-1:2017
- Bintara S. 2011. Rasio X:Y dan kualitas sperma pada kambing kacang dan peranakan ettawa. Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. *Sains Peternakan* 9(2):65-71.
- Buettner GR. 1993. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate. *Biochemistry and Biophysics* 300(2): 535-543.
- Butar-Butar E. 2009. Efektifitas frekuensi exercise terhadap peningkatan kualitas semen sapi Simmental. *Skripsi. Fakultas Pertanian, Universitas Sumatra Utara. Medan.*
- Campbell JR, Campbell KL, Kenealy MD. 2003. *Artificial insemination. In: Animal Sciences* 4th ed. New York, Mc Graw-Hill.

- Feradis MP. 2010. Bioteknologi reproduksi pada ternak. *Alfabeta. Bandung*.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma in Reproduction In Farm Animals. Lea and Febiger, Philadelphia. 144-164
- Hardijanto SS, Hernawati T, Sardjito T, Suprayogi TW. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. *Universitas Airlangga. Surabaya. Hal, 40*.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya, DJ. 2002. Antioksidan flavonoid: hubungan kimia, metabolisme dan struktur-aktivitas. *The Journal of nutrisi biokimia* 13 (10): 572-584.
- Hidayahturrahmah. 2007. Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio L*) pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa. *Jurnal Bioscientiae* 4 (1): 9-18.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyapraphatsara N, Sato H, Herunsale A, Suthisisang C. 2005. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of Hibiscus sabdariffa Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biology Pharmacy Buletin* 28(3): 481--484.
- Ihsan MN. 2011. Penggunaan telur itik sebagai pengencer semen kambing. *J Ternak Tropika* 12 (1): 10-14.
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi inseminasi buatan pada sapi dan kerbau*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Labetubun J, Siwa IP. 2011. Kualitas spermatozoa kauda epididimis sapi Bali dengan penambahan laktosa atau maltosa yang dipreservasi pada suhu 3-5oC. *Jurnal Veteriner* 12(3): 200-207.
- Kamal A, Gubartallah, Ahmed A, Amel, Bakhiet O, Babiker A. 2005. Comperative studies on reproduktif performance of nubian and saanen buck under the climatic conditions of khartoum. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 4(11) : 942-944.
- Mahadevan N, Kamboj P. 2009. Hibiscus sabdariffa Linn. - An overview. *Natural Product Radiance* 8(1): 77-83
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polifenol: sumber makanan dan ketersediaan hayati. *Jurnal nutrisi klinis Amerika* 79 (5):727-747.
- Mardiyah E. 2001. Teknik pengenceran pada pembuatan chiling semen sapi. Temu tehnis non peneliti, Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Pertanian. Bogor.
- Mittal P, Gupta V, Kaur G, Garg AK, Singh A. 2010. Phytocimistry and pharmacological activities of Psidium guajava. A Review. *IJPSR* 1(9): 9-19.
- Nijveldt RJ, Van Nood ELS, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. 2001. Flavonoid: tinjauan kemungkinan mekanisme aksi dan aplikasi potensial. *Jurnal*

- nutrisi klinis Amerika* 74 (4): 418-425.
- Oteiza PI, Erleijman AG, Verstraeten SV, Keen CL, Fraga CG. 2005. Flavonoid-membrane interactions: A protective role of flavonoidscat the membrane surface? *Clinical and Developmental Immunology* 12(1): 19-25.
- Parera F, Prihatiny Z, Souloka DF, Rizal M. 2009. Pemanfaatan sari wortel sebagai pengencer alternatif spermatozoa epididimis sapi bali. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 34(1): 50-56.
- Rizal M. 2009. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi bali yang dipreservasi pada suhu 3-5°C dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda.. *JITV* 14(2):142-149.
- Rizal M, Herdis. 2006. Daya hidup spermatozoa epididimis domba garut yang di kriopreservasi menggunakan modifikasi pengencer tris. *J. Hayati* 12(2):61-66.
- Sabile S, Toleng AL, Yusuf M, Firmiaty S, Idrus M. 2016. pengaruh penambahan ekstrak buah mengkudu (*Morinda Citrifolia* Linn) dalam pengencer terhadap motilitas spermatozoa pada semen cair Sapi Bali. *Aves: Jurnal Ilmu Peternakan* 10(2): 2-2.
- Savitri FK, Sri S, Siswanto. 2014. Kualitas semen beku sapi bali dengan penambahan berbagai dosis vitamin c pada bahan pengencer skim kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(3):30-36.
- Setyaningsih VR. 2011. Pengaruh pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus subdariffa* L) secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L) jantan galur DDT. *Skripsi..* Depok, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Departemen Biologi.
- Siahaan EA, Laksmi DNDI, Bebas WAYAN. 2012. Efektivitas penambahan berbagai konsentrasi  $\beta$ -karoten terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali post thawing. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(2):239-251.
- Sikka SC. 1996. Stres oksidatif dan peran antioksidan dalam fungsi sperma normal dan abnormal. *Frontiers dalam bioscience: jurnal dan perpustakaan virtual* 1 (13): 78-86.
- Solihati N, Idi R, Darojah SR, Rizal M, Fitriati M. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi Peranakan Ongole (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *Animal Production*. 1 (10) : 22-29
- Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. 2014. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis pejantan unggul. fakultas kedokteran hewan, institut pertanian bogor. *JITV* 19(3):168-175.
- Suryohudoyo P. 2000. Oksidan, antioksidan dan radikal bebas. *Di dalam: Kapita Selektta Ilmu Kedokteran Molekuler.*

Jakarta: CV Sagung Seto. hlm, 31-47.

Susilawati T, Isnaini N, Yekti PAA, Nurjannah I, Errico E, da costa N. 2010. Keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen beku dan semen cair pada sapi peranakan ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 26(3), 14–19.

Susilawati T, Wahyudi FE, Anggraeni I, Isnaini N, Ihsan MN. 2016. Penggantian Bovine Serum Albumin pada Pengencer cep-2 dengan Serum Darah Sapi dan Putih Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Limousin Selama Pendinginan. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 10(2):98-102.

Widjaya, N. 2011. Pengaruh Pemberian Susu Skim dengan Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi pada Suhu Penyimpanan 5°C. *Sains Peternakan: Jurnal Penelitian Ilmu Peternakan* 9(2): 72-76.

Winarsi, H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta, hlm 177-178.

Yani, A., Nuryadi, dan T. Pratiwi. 2001. Pengaruh tingkat substitusi santan kelapa pada pengencer tris dan waktu penyimpanan terhadap kualitas semen kambing peranakan ettawah (PE). *Jurnal Biosain* 1(1):23-29