

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sapi Pejantan Limousin

Sapi pejantan Limousin adalah salah satu sapi dari bangsa *Bos taurus* yang dikembangkan di Prancis Tengah. Sapi pejantan Limousin merupakan sapi pedaging karena ukuran tubuhnya yang besar (Blakely and Bade, 1998). Karakteristik sapi pejantan Limousin memiliki warna bulu merah kecoklatan dan terdapat bentuk lingkaran berwarna putih di sekitar mata (Pane, 2006). Sapi *Bos taurus* (Limousin) disukai banyak peternak karena memiliki ukuran tubuh yang besar dengan kecepatan pertumbuhan yang sedang-tinggi dan sifat reproduksi tinggi (Ihsan dan Wahjuningsih, 2011). Nilai *recovery rate* (RR) atau kemampuan spermatozoa pulih kembali setelah proses pembekuan dengan membandingkan dengan persentase spermatozoa motil didapatkan hasil bahwa nilai RR sapi pejantan Limousin memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai RR sapi Simmental dan FH (Sukmawati, Arifiantini dan Purwantara, 2014). Berikut merupakan salah satu pejantan unggul sapi Limousin yang dipelihara di BBIB Singosari Malang.



Gambar 1. Pejantan unggul sapi Limousin (Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, 2018)

Sapi Limousin pada kelompok umur 3 tahun menunjukkan konsentrasi yang paling tinggi dibandingkan dengan kelompok umur 9, dan 11 tahun. Rata-rata pH semen sapi limousin yang ada di BIB Lembang sebesar $6,5117 \pm 0,15283$ dengan rentang 6,3 – 6,6 (Sundari, Tagama dan Maidaswar, 2013). Viabilitas semen segar sapi pejantan Limousin sebesar $83,09 \pm 2,2\%$ (Nugroho, Susilawati dan Wahjuningsih, 2014). Kualitas semen segar sapi Limousin tertera pada Tabel 1.

Tabel 1 Kualitas semen segar sapi Limousin

Parameter	Rata-rata \pm SD
Warna	Putih kekuningan
Konsistensi	Kental
pH	$7,00 \pm 0,00$
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	$70,00 \pm 0,00$
Konsentrasi spermatozoa ($10^6/ml$)	$1891,5 \pm 47,70$
Viabilitas (%)	$96,66 \pm 2,22$
Abnormalitas (%)	$6,84 \pm 4,40$

Sumber: Indriani, Susilawati dan Wahyuningsih (2013)

2.2 Pengencer Susu Skim Kuning Telur

Pengenceran memiliki prinsip dan tujuan menambah volume semen dan memberikan energi untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa selama proses pendinginan hingga pembekuan, meminimalisir tumbuhnya mikroorganisme dan menjaga kestabilan pH (Mumu, 2009). Syarat-syarat pengencer harus mempunyai daya preservasi yang baik, murah, sederhana dan mudah didapatkan, mampu

mempertahankan daya fertilitas, mengandung unsur-unsur yang hampir sama dengan spermatozoa, tidak toksik dan sesudah pengenceran pergerakan sel masih dapat diamati (Ismaya, 2014). Susu skim adalah bagian yang tertinggal setelah proses pengambilan krim susu. Susu skim digunakan sebagai media pengencer karena harganya yang murah, kadar lemak rendah dan mudah diamati dibawah mikroskop (Yatusholikhah, Isnaini dan Ihsan, 2015). Susu skim digunakan sebagai bahan pengencer karena mengandung protein dan glukosa yang berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Kandungan laktosa dalam pengencer susu skim dapat meningkatkan metabolisme dan asam laktat sehingga dapat menyebabkan spermatozoa mati (Albiaty, Alobaidi, Kareem, Al-Hakim, Alnaeb *and* Alkhazraji, 2016). Susu skim merupakan antioksidan non-enzimatis yang berfungsi dengan mengkompensasi atau mengganti untuk hasil yang hilang akibat perpindahan seminal plasma (Fu, Li, Wang, Zhen, Yang, Li *and* Li, 2017). Kasein susu dalam susu skim menurunkan pengikatan protein seminal plasma untuk spermatozoa dan mengurangi hilangnya lemak spermatozoa ketika pemeliharaan motilitas dan viabilitas sperma selama penyimpanan. Pembekuan semen sapi menggunakan pengencer susu skim tanpa lemak dan pengencer tris sangat biasa digunakan (Gangwar, Kharche, Kumar *and* Jindal, 2016). Penambahan fruktosa sebagai krioprotektan ekstraseluler dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa dengan cara melindungi membran plasma sel dari kerusakan (Rizal, 2008). Susu skim mengandung lemak yang akan menghambat pergerakan spermatozoa sehingga menyebabkan nilai motilitas individu rendah karena terhambat globula lemak (Suharyati dan Hartono, 2014).

Kandungan karbohidrat dalam pengencer susu skim berfungsi sebagai substrat energi dan berperan menstabilkan membran plasma selama pendinginan. Protein berfungsi untuk menstabilkan permeabilitas membran plasma. Vitamin berfungsi untuk mencegah terjadinya peroksidasi lipid selama pembekuan. Kalium dan natrium menjaga tekanan osmotik dan menjaga integritas fungsi membran plasma (Sades, Isnaini dan Wahjuningsih, 2016). Air susu mengandung laktenin yang bersifat racun dan dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel spermatozoa, untuk mencegah toksisitas laktenin perlu ditambahkan gugus -SH seperti cystein hydroclorida (Ismaya, 2014).

Kuning telur mengandung *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang bertanggung jawab untuk melindungi spermatozoa selama kriopreservasi. LDL menempel pada membran sperma dan memberi perlindungan dengan penggunaan kuning telur sebesar 10% (Gangwar, *et al.*, 2016). Kuning telur masuk dalam krioprotektan ekstraseluler yang memiliki molekul besar sehingga tidak dapat menembus membran sel spermatozoa (Sari, dkk., 2014).

2.3 Biji Pinang (*Areca catechu* L.)

Buah pinang (*Areca catechu* L.) tersebar luas di Asia bagian Tenggara dan Selatan meliputi China, India, Indonesia, Malaysia, Philipina, Papua New Guinea dan lainnya. Buah pinang terkenal sebagai obat herbal tradisional (Peng, Liu, Wu, Sun, He, Gao *and* Wu, 2015). Buah pinang (*Areca catechu* L.) masuk dalam famili *Arecaceae* dengan tinggi pohon hingga 15-20 m, berbuah umur 5-8 tahun dengan masa hidup 25-30 tahun, biji buah berwarna coklat sampai coklat kemerahan (Susanti dan Prabowo, 2014).

Klasifikasi tanaman pinang dan buah pinang sebagai berikut (Anonimus, 2018):

Kingdom : Plantae
Clade : Angiosperms
Clade : Monocots
Clade : Commelinids
Order : Arecales
Family : Arecaceae
Genus : *Areca*
Species : *A. catechu*



a



b

Gambar 2. Tanaman pinang (*Areca catechu* L.) a). Pohon pinang dan b). Buah pinang

Senyawa yang terkandung di dalam biji buah pinang sangat beragam, meliputi alkaloid, tanin terkondensasi, tanin terhidrolisis, flavan, senyawa fenolik, asam galat (Harnowo dan Yuniarta, 2015) triterpenes dan steroid, asam lemak senyawa lainnya (Peng, *et al.*, 2015). Senyawa alkaloid yang terkandung di dalam ekstrak terung belanda memiliki efek yang dapat merusak morfologi spermatozoa seperti ekor kembar, kepala besar, ekor melilit, kepala kembar, sitoplasma duplet dan ekor patah (Rafiq, Ramadhan dan Tureni, 2013).

Alkaloid yang berasal dari ekstrak tanaman mampu menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Alkaloid mampu mengganggu homeostatis internal untuk ion natrium dan kalium. Selain homeostatis, alkaloid dapat mengganggu permeabilitas membran sehingga transportasi zat-zat nutrisi akan terganggu (Akmal, dkk., 2008). Biji pinang mengandung senyawa alkaloid seperti arekolin dan tanin yang bersifat racun dan dapat merusak membran serta menghambat kerja enzim (Susanti dan Prabowo, 2014). Senyawa arekolin dalam biji pinang dapat menyebabkan persentase sel hidup mengalami penurunan seiring kenaikan kadar ekstrak pinang (Meiyanto, Susidarti, Handayani dan Rahmi, 2008)

Proses ekstraksi yaitu proses memisahkan beberapa zat yang menyatu menjadi komponen yang terpisah. Kualitas ekstraksi ditentukan oleh pelarut yang digunakan. Pelarut yang digunakan tidak boleh toksik, harganya murah, mudah di dapat, tidak mudah terbakar dan reaktivitasnya (Mamonto, Runtuwene dan Wehantouw, 2014). Meiyanto, dkk., (2008) menyatakan bahwa ekstrak etanolik dari biji buah pinang (*Areca catechu* L.) memiliki aktivitas antioksidan yang dapat mencegah kanker serta tidak menginduksi perubahan kromosom. Ismail, dkk., (2012) menyatakan bahwa biji pinang yang diekstraksi menggunakan etanol 96% memiliki kandungan total fenol sebesar 85,92 mg/kg dan aktivitas antioksidan sebesar 88,16%. Kadar tanin yang diekstraksi menggunakan etanol 96% memiliki nilai sebesar 8,53% lebih tinggi daripada menggunakan pelarut air yang hanya sebesar 6,45% (Sulastri, 2009).

2.4 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu memadamkan reaksi radikal bebas dan mengakhiri siklus reaksi radikal bebas. Antioksidan dapat meningkatkan fertilitas semen beku, namun tidak pada semen segar. Antioksidan dikelompokkan menjadi 3 kelompok, yaitu kelompok antioksidan sebenarnya (*true antioxidant*), kelompok agen pereduksi (*reducing agent*) dan kelompok sinergis antioksidan (*antioxidant synergist*) (Feradis, 2009). Antioksidan termasuk senyawa nukleofilik yang mampu mereduksi, menekan radikal bebas yang bisa terjadi di dalam proses pembekuan. Reaksi radikal bebas dapat merusak tiga senyawa penting dalam mempertahankan integritas sel, senyawa-senyawa tersebut yaitu DNA, asam lemak dan protein. Proses respirasi mitokondria oksigen akan mengalami reduksi, dan proses reduksi tersebut yang akan menghasilkan radikal bebas dan akan bereaksi dengan asam lemak jenuh sehingga menghasilkan peroksidasi lipid (Rizal dan Herdis, 2010). Mamonto, dkk., (2014) menyatakan antioksidan merupakan senyawa yang digunakan untuk melindungi lipida, protein, vitamin dan DNA dari proses oksidasi yang bisa menyebabkan kerusakan, ketengikan dan perubahan warna. Pelarut ekstraksi yang lebih polar akan mampu mengekstraksi golongan semua flavonoid sehingga senyawa flavonoid dapat terekstraksi dengan baik yang mana flavonoid merupakan salah satu senyawa antioksidan. Indikator senyawa dapat dikatakan sebagai zat antioksidan yaitu mempunyai daya reduksi karena mampu menstabilkan radikal dengan mendonorkan atom hidrogen sehingga menjadi lebih stabil.

Antioksidan mempunyai kemampuan melawan lipid peroksidase dan dapat mempertahankan motilitas dan

viabilitas spermatozoa. Penambahan antioksidan diharapkan mampu mengurangi kerusakan membran sehingga dapat mempertahankan fertilitas spermatozoa (Iswati, Isnaini dan Susilawati, 2016). Kerusakan membran sel spermatozoa merupakan akibat dari hasil samping metabolisme spermatozoa dalam bentuk *Reactive Oxygen Species (ROS)* dan dapat ditekan pembentukannya dengan memberikan antioksidan (Agung, Handang dan Mirandy, 2013).

2.5 Pembekuan Semen

Pembekuan atau teknik kriopreservasi adalah teknik menyimpan sel tumbuhan, hewan, materi genetika pada suhu rendah (-196°C) tanpa mengubah fungsi fisiologis, biologis dan morfologis. Teknik kriopreservasi sangat berguna untuk plasma nutfah maupun konservasi hewan atau tumbuhan langka (Kostaman dan Setioko, 2011). Pembekuan spermatozoa merupakan proses menghentikan hidup spermatozoa sementara waktu tanpa mematikan sel sehingga energi tidak terbuang dan bisa digunakan setelah proses pembekuan selesai (Mumu, 2009). Pembekuan merupakan fenomena pengeringan fisik, pelarut yang dibekukan akan membentuk kristal-kristal es dan dapat merusak membran spermatozoa secara mekanik (Hoesni, 2016). Menurut Ariantie, Yusuf dan Sajuthi (2013) saat proses pembekuan diperlukan krioprotektan dan bahan pengencer yang tepat untuk mengurangi kerusakan membran sel spermatozoa akibat terbentuknya kristal-kristal es. Spermatozoa beku adalah spermatozoa yang telah mengalami proses pengenceran dan ditambahkan gliserol untuk proses pembekuan. Proses pembekuan dilakukan secara bertahap atau langsung di dalam media nitrogen cair suhu -196°C. Masa simpan semen beku

dapat mencapai 30 tahun dan akan mengalami penurunan (Ismaya, 2014).

Proses pembekuan dapat mengakibatkan peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid yang terlalu lama akan mengakibatkan rusaknya struktur matrik lipid sehingga membran sel tidak stabil dan fungsi membran dapat berubah (Sukmawati, dkk., 2014). Pembekuan spermatozoa dinyatakan berhasil dapat dilihat melalui perbandingan antara motilitas sperma setelah pembekuan dengan motilitas sperma semen segar dan tingkat Membran Plasma Utuh (MPU) (Rizal, Herdis, Nasrullah, Riyadhi, Sangadji dan Yulnawati, 2015). Setelah proses pembekuan dilakukan *thawing*, proses *thawing* berpengaruh terhadap stabilitas dan fungsi hidup spermatozoa. *Thawing* semen merupakan suatu prosedur yang sangat kritis dan memiliki peran yang potensial terhadap motilitas. Suhu dan lama *thawing* sangat berpengaruh besar terhadap keutuhan membran spermatozoa (Zelpina, Rosadi dan Sumarsono, 2012). Pencairan kembali menggunakan air suhu 32-35°C dilakukan selama 12-15 detik atau menggunakan air keran dilakukan selama 45-60 detik (Ismaya, 2014).