

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi Limousin

Semen segar hasil penampungan di BBIB Singosari Malang segera dibawa ke Laboratorium untuk dilakukan uji kualitas semen secara makroskopis meliputi volume, pH, warna, konsistensi dan mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi. Hasil uji kualitas semen segar sapi Limousin dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 1. Rata-rata kualitas semen segar sapi Limousin

Kualitas Semen Segar Sapi Limousin	
Parameter	Rata-Rata ± SD
Makroskopis	
Volume	5,62±1,55
pH	6,5±0,14
Warna	Putih Susu
Konsistensi	Sedang – Kental
Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	43,5±3,37
Viabilitas (%)	73,92±5,62
Abnormalitas (%)	15,46±6,86
Konsentrasi (10 ⁶ spermatozoa/ml)	1438,5±381,58

Hasil pengujian kualitas semen segar diambil dari sapi pejantan Limousin di BBIB Singosari Malang dengan rata-rata umur 8,8 tahun. Volume semen dapat ditentukan dengan

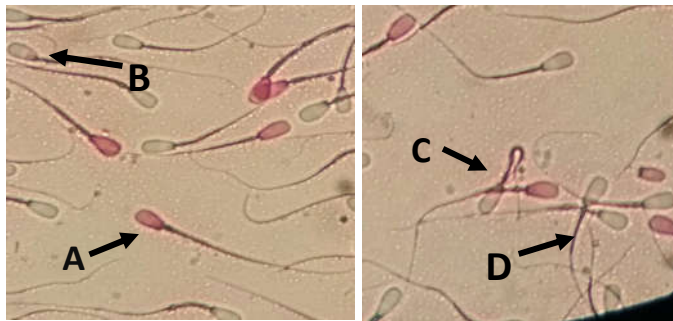
melihat skala pada tabung yang digunakan untuk menampung semen. Berdasarkan Tabel 2, nilai rata-rata volume semen sapi pejantan Limousin sebesar $5,62 \pm 1,55$ ml. Volume semen tersebut termasuk masih normal. Susilawati (2013) menyatakan bahwa volume semen sapi setiap penampungan bervariasi antara 1-15 ml atau 5-8 ml. Arifiantini (2012) menambahkan bahwa volume semen sapi berkisar antara 2-15 ml dengan rata-rata 4-8 ml. Volume semen yang bervariasi dikarenakan faktor internal maupun eksternal, seperti umur, musim, nutrisi, bangsa, frekuensi ejakulat, libido dan kondisi ternak (Tripriliawan, Saleh dan Suparman, 2014).

Derajat keasaman (pH) semen diukur dengan menggunakan kertas indikator pH. Berdasarkan hasil pada Tabel 2, pH semen yang digunakan masih termasuk normal dengan rata-rata $6,5 \pm 0,14$. Arifiantini (2012) menyebutkan bahwa derajat keasaman semen mamalia yaitu antara 6-7,5. Susilawati (2013) menyatakan daya tahan spermatozoa ditentukan oleh tingkat keasaman semen. pH yang terlalu rendah disebabkan oleh produksi asam laktat dan proses metabolisme spermatozoa. Warna semen yang digunakan yaitu putih susu termasuk kategori normal, menurut Susilawati (2011) warna semen sapi yang normal yaitu putih susu atau putih kekuningan. Arifiantini (2012) menyatakan warna semen dapat dipengaruhi oleh sekresi kelenjar aksesoris dan juga dipengaruhi pakan.

Motilitas massa semen segar dari pejantan sapi pejantan Limousin yang ditampung yaitu ++ yang berarti terdapat gelombang massa yang tebal tetapi lambat berpindah tempat. Hasil rata-rata motilitas individu menunjukkan angka sebesar $43,5 \pm 3,37\%$. Nilai motilitas individu tersebut termasuk dalam kualitas yang rendah, karena menurut Ducha,

Susilawati, Aulanni'am dan Wahyuningsih (2013) bahwa motilitas massa dan motilitas individu yaitu minimal ++ untuk motilitas massa dan 70% untuk motilitas individu.

Persentase viabilitas atau hidup spermatozoa dilakukan dengan melakukan pewarnaan menggunakan pewarna *eosin*. Hasil rata-rata persentase viabilitas spermatozoa sapi pejantan Limousin yang digunakan yaitu $73,92 \pm 5,62\%$. Persentase viabilitas semen sapi pejantan Limousin tersebut lebih rendah dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Nugroho, Susilawati dan Wahjuningsih (2014) bahwa viabilitas semen segar sapi pejantan Limousin sebesar $83,09 \pm 2,2\%$. Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa yang digunakan dalam penelitian ini sebesar $15,46 \pm 6,86\%$. Nilai rata-rata tersebut tergolong baik karena menurut Garner dan Hafez (2008) abnormalitas spermatozoa yang baik tidak lebih dari 20%. Berikut ulasan viabilitas dan abnormalitas spermatozoa pada Gambar 6.



Gambar 1. Viabilitas dan abnormalitas diamati dibawah mikroskop perbesaran 400X; A) Spermatozoa mati berwarna merah, B) Spermatozoa hidup berwarna transparan, C) Spermatozoa abnormal dan D) Spermatozoa normal

Konsentrasi semen segar sapi pejantan Limousin yang digunakan memiliki rata-rata sebesar $1438,5 \pm 381,58 \times 10^6/\text{ml}$ dengan konsistensi encer hingga kental. Menurut Susilawati (2013) konsentrasi semen sapi berkisar antara 1000-1800 juta spermatozoa/ml. Konsentrasi spermatozoa berkorelasi dengan konsistensi semen, konsistensi dinilai encer apabila konsentrasi $<1000.10^6$ spermatozoa/ml, dinilai sedang apabila konsentrasi 1000.10^6 - 1500.10^6 spermatozoa/ml dan dinilai kental apabila konsentrasi $>1500.10^6$ spermatozoa/ml. Konsentrasi spermatozoa yang bervariasi disebabkan oleh faktor umur, musim, serta kesehatan ternak tersebut (Tripriliawan, dkk., 2013).

4.2 Evaluasi Motilitas Individu Spermatozoa Semen Beku Sapi Limousin Setelah Penyimpanan Suhu -80°C

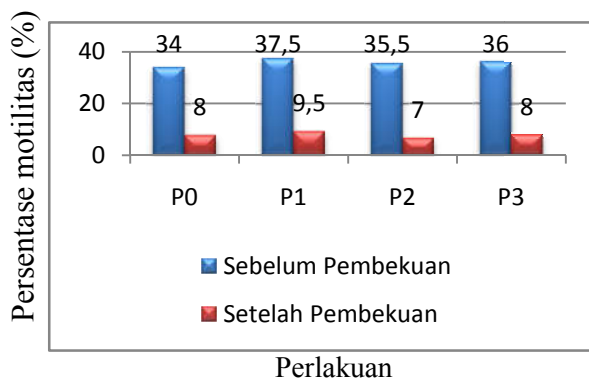
Motilitas individu spermatozoa merupakan penilaian gerakan spermatozoa secara individu. Motilitas menentukan kemampuan untuk menembus serviks sampai ke ovum hingga fertilisasi terjadi. Hasil evaluasi persentase motilitas individu spermatozoa pada berbagai perlakuan yang disimpan pada suhu -80°C ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 2. Rata-rata persentase motilitas individu spermatozoa sapi Limousin pada berbagai perlakuan yang disimpan pada suhu -80°C

Perlakuan	Rata-rata±SD(%)	
	Sebelum Pembekuan	Setelah Pembekuan
P0	34±3,94	8±4,22
P1	37,5±2,64	9,5±3,69
P2	35,5±4,38	7±4,83
P3	36±4,60	8±3,50

Tabel 4 menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa sapi pejantan Limousin mengalami penurunan selama proses pembekuan lambat. Berdasarkan analisis ragam (Lampiran 2) menjelaskan bahwa motilitas spermatozoa saat sebelum pembekuan dan setelah pembekuan tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P>0,05$) terhadap ketiga perlakuan penambahan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.). Hal ini menunjukkan bahwa setiap perlakuan memberikan respon yang sama terhadap motilitas spermatozoa. Hasil rata-rata motilitas spermatozoa diatas dapat diartikan bahwa ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) tidak dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi pejantan Limousin pada penyimpanan suhu -80°C. Perbedaan yang tidak terjadi secara nyata bisa disebabkan karena semen yang digunakan memiliki kualitas awal yang rendah, sehingga proses peroksidasi sudah terjadi dan tidak dapat dihentikan dengan penambahan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) sebagai sumber antioksidan (Beconi, Frarcia, Mora and Affranchino, 1993). Grafik hasil pengamatan kualitas sebelum pembekuan dan setelah

pembekuan motilitas individu keempat perlakuan disajikan pada Gambar 7.



Gambar 2. Rata-rata persentase motilitas individu spermatozoa disimpan pada suhu -80°C

Persentase motilitas individu spermatozoa pada pengamatan setelah pembekuan memiliki nilai yang rendah (Gambar 7), hal ini diduga disebabkan oleh adanya senyawa tanin dalam ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) yang cukup tinggi. Susanti dan Prabowo (2014) mengatakan bahwa biji buah pinang mengandung alkaloid salah satunya yaitu tanin. Tanin dapat menghambat enzim dan merusak membran yang menyebabkan paralisis dan akhirnya menyebabkan kematian. Akmal, Aulanni'am, Rasmaidar, Dasrul, Siregar dan Rahmi (2008) membenarkan bahwa kandungan alkaloid dalam biji pinang dapat menurunkan motilitas dan viabilitas akibat terganggunya permeabilitas membran.

Selama proses pembekuan hingga *thawing* spermatozoa sangat rentan terhadap kerusakan membran dan perubahan suhu. Menurut Rizal dan Herdis (2010), pada saat proses pembekuan berlangsung air dari dalam sel akan

dikeluarkan secara besar-besaran sehingga konsentrasi elektrolit intraseluler akan meningkat dan kristal-kristal es akan terbentuk. Saat proses *thawing* akan terjadi peningkatan aktivitas metabolisme akibat tekanan yang berat oleh perubahan suhu yang drastis, sehingga mengakibatkan meningkatnya konsentrasi radikal bebas. Spermatozoa sapi diketahui mengandung asam lemak tidak jenuh yang dapat memicu peningkatan radikal bebas. Feradis (2009) mengatakan bahwa radikal bebas sangat reaktif apabila bereaksi dengan asam lemak tak jenuh. Reaksi ini akan membentuk rantai-rantai dan semakin lama akan mengakibatkan peroksidasi lebih lanjut. Pembekuan lambat menggunakan alat *Mr. Frosty*® dengan suhu -80°C diduga salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya angka motilitas spermatozoa setelah *thawing*. Alat *Mr. Frosty*® bekerja dengan penurunan suhu 1°C/menit sehingga membutuhkan waktu yang lama untuk mencapai suhu -80°C. Menurut Sukmawati, dkk., (2014) kerusakan membran spermatozoa terjadi antara suhu -15 sampai -60°C. Pada saat proses *pre-freezing* menggunakan alat Digitcool 5300 ZB 250 IMV Prancis, penurunan dari suhu 4 hingga -140°C dilakukan selama 7 menit. Jadi, Supit, Kusumaningrum dan Angi (2015) menambahkan bahwa titik kritis spermatozoa berada pada suhu 1,5 sampai -30°C yang harus dilewati secara cepat untuk menghindari kerusakan membran.

4.3 Evaluasi Viabilitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Limousin Setelah Penyimpanan Suhu -80°C

Viabilitas spermatozoa atau persentase spermatozoa hidup berhubungan dengan nilai motilitas spermatozoa. Spermatozoa hidup diamati menggunakan preparat ulas,

spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna dan yang mati akan menyerap warna atau berwarna merah muda. Hasil pengamatan rata-rata viabilitas spermatozoa pada semen segar yaitu $73,92 \pm 5,62\%$. Rata-rata persentase setelah mendapat perlakuan dan disimpan pada suhu -80°C dapat dilihat pada Tabel 5.

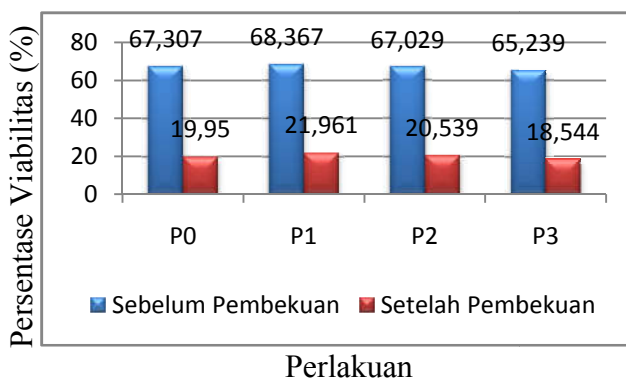
Tabel 3. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa sapi Limousin pada berbagai perlakuan yang disimpan pada suhu -80°C

Perlakuan	Rata-rata \pm SD(%)	
	Sebelum Pembekuan	Setelah Pembekuan
P0	67,31 \pm 8,17	19,95 \pm 7,15
P1	68,37 \pm 11,78	21,96 \pm 6,76
P2	67,01 \pm 7,54	20,54 \pm 10,91
P3	65,24 \pm 8,43	18,54 \pm 6,80

Hasil analisis ragam pada Lampiran 3 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dengan berbagai level tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P>0,05$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa setiap perlakuan memberikan respon yang sama terhadap persentase viabilitas spermatozoa. Hal ini diduga karena pengaruh penggunaan pengencer susu skim yang dapat menurunkan motilitas dan produksi ROS akan lebih tinggi (Albiaty, *et al.*, 2016). Hal ini sesuai dengan pernyataan Suharyati dan Hartono (2011) bahwa pada pengencer susu skim yang memiliki kandungan laktosa yang

tinggi dapat meningkatkan metabolisme dan asam laktat sehingga dapat menyebabkan spermatozoa mati.

Berdasarkan data hasil penelitian diketahui bahwa persentase spermatozoa hidup lebih tinggi dibandingkan persentase motilitas pada keempat perlakuan, hal itu disebabkan karena spermatozoa yang tidak bergerak belum tentu mati. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pratiwi, Suharyati dan Hartono (2014) bahwa spermatozoa yang bergerak secara perlahan tidak akan menyerap warna eosin, serta spermatozoa yang tidak ada pergerakan belum tentu mati dan tidak menghisap warna eosin. Suharyati dan Hartono (2011) menambahkan bahwa kandungan lemak susu skim akan menghambat pergerakan spermatozoa. Zelpina, Rosadi dan Sumarsono, (2012) menyatakan bahwa persentase viabilitas yang tinggi menandakan keadaan membran plasma spermatozoa masih utuh sehingga metabolisme sel akan berjalan dengan baik. Grafik hasil pengamatan kualitas sebelum pembekuan dan setelah pembekuan persentase viabilitas spermatozoa keempat perlakuan disajikan pada Gambar 8.



Gambar 3. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa disimpan pada suhu -80°C

Pada perlakuan P2 dan P3 persentase viabilitas cenderung menurun diduga karena adanya senyawa tanin yang cukup tinggi apabila dilakukan ekstrak menggunakan pelarut etanol dan senyawa tanin dapat menurunkan motilitas dan viabilitas spermatozoa dengan cara merusak membran sel (Sulastri, 2009; Akmal, dkk., 2008). Menurut Herdis, Kusuma, Surachman dan Angga (2011) rusaknya membran plasma diakibatkan oleh peroksidasi lipid akibat proses metabolisme spermatozoa yang akan berpengaruh terhadap motilitas. Membran plasma yang rusak akan diikuti dengan rusaknya tudung akrosom dan menyebabkan enzim-enzim untuk fertilisasi akan keluar.

Persentase viabilitas dari keempat perlakuan terjadi penurunan (Gambar 8), hal ini diduga karena pada saat pembekuan dengan suhu yang sangat rendah akan mengakibatkan enzim intraseluler, lipoprotein dan ATP berkurang dan membran plasma akan rusak sehingga viabilitas akan menurun. Keadaan ini tidak dapat dihindari karena selama proses pengenceran hingga pembekuan semen mengalami perubahan suhu lingkungan yang ekstrim (Sukmawati, dkk., 2014). Munazaroh, dkk., (2013) menambahkan bahwa penurunan persentase viabilitas dapat diakibatkan karena gesekan antar spermatozoa, antara spermatozoa dengan dinding tabung atau antara globul lemak dari kuning telur.

4.4 Evaluasi Abnormalitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Limousin Setelah Penyimpanan Suhu -80°C

Hasil pengamatan pada semen segar diperoleh persentase abnormalitas spermatozoa sebesar $15,46 \pm 6,86\%$.

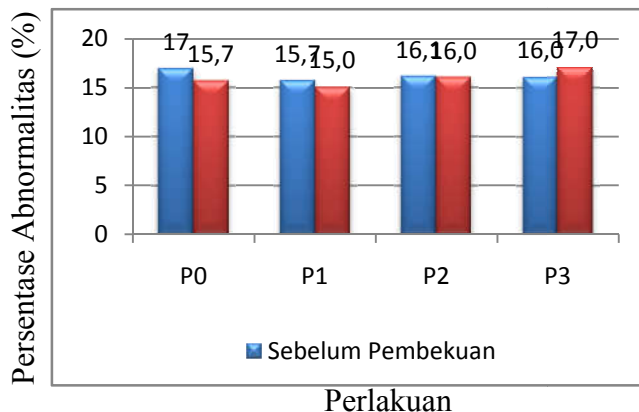
Setelah dilakukan pengenceran dan pembekuan pada suhu -80°C didapatkan hasil seperti pada Tabel 6.

Tabel 4. Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa sapi Limousin pada berbagai perlakuan yang disimpan pada suhu -80°C

Perlakuan	Rata-rata \pm SD(%)	
	Sebelum Pembekuan	Setelah Pembekuan
P0	16,86 \pm 8,15	15,65 \pm 6,34
P1	15,68 \pm 6,18	14,99 \pm 6,45
P2	16,09 \pm 8,52	15,99 \pm 8,21
P3	16,03 \pm 8,36	17,05 \pm 8,45

Hasil analisis ragam pada Lampiran 4 menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) dengan berbagai level tidak memberikan pengaruh yang nyata ($P>0,05$) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa setiap perlakuan memberikan respon yang sama terhadap persentase abnormalitas spermatozoa. Hal ini diduga karena pengenceran ekstrak pinang yang digunakan lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian Akmal, dkk., (2008) bahwa ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.) yang digunakan setiap 1 ml mengandung 2 g ekstrak biji pinang (*Areca catechu* L.). Hasil yang tidak berbeda nyata dalam penelitian ini diduga karena penanganan yang salah saat pembuatan ulasan, pembekuan dan pencairan kembali yang dapat merusak lipoprotein sehingga terjadi keabnormalan sekunder (Garner and Hafez, 2000). Arifiantini (2012) menambahkan bahwa keabnormalan sekunder lebih sering

terjadi pada bagian ekor ketika penilaian pergerakan spermatozoa. Grafik hasil pengamatan kualitas sebelum pembekuan dan setelah pembekuan persentase abnormalitas spermatozoa keempat perlakuan disajikan pada Gambar 9.



Gambar 4. Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa disimpan pada suhu -80°C

Persentase abnormalitas pada pengamatan setelah pembekuan menunjukkan nilai yang sangat tinggi (Gambar 9), hal itu diduga karena kesalahan saat membuat ulasan yang dapat menyebabkan terputusnya ekor dan kepala spermatozoa serta akibat *cold shock* pada proses pendinginan (Sades, dkk., 2016). Aprioku (2013) menambahkan jumlah ROS yang berlebih akan memperluas peroksidasi lipid sehingga DNA spermatozoa akan mengalami kerusakan dan akan mengakibatkan kelainan morfologi. Munazaroh, dkk., (2013) menjelaskan lebih lanjut bahwa abnormalitas spermatozoa akan meningkat saat pendinginan dan pembekuan disebabkan oleh pengaruh fisik dari spermatozoa. Suhu yang berubah secara drastis bisa menyebabkan permeabilitas membran

dinding sel berubah dan mengakibatkan disharmonisme, pemecahan membran dan pengeluaran enzim sehingga mengakibatkan abnormalitas meningkat. Menurut Rafiq, dkk. (2013) menyatakan kandungan senyawa alkaloid diduga dapat merusak morfologi spermatozoa seperti ekor kembar, ekor patah, kepala besar, ekor melilit, kepala kembar serta sitoplasma duplet.