

# PENGARUH PENAMBAHAN VITAMIN C DALAM PENGECER ANDROMED<sup>®</sup> TERHADAP PERSENTASE MOTILITAS DAN MEMBRAN PLASMA UTUH SPERMATOZOA SAPI ACEH SETELAH PEMBEKUAN

*The Effect of Vitamin C Addition in Andromed<sup>®</sup> Dilution on Procentage of Motility and Spermatozoa Intact Plasma Membrane of Aceh Bull After Freezing*

Hasan Al Aslam<sup>1</sup>, Dasrul<sup>2</sup>, dan Rosmaidar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>3</sup>Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: dasrul\_darni@yahoo.com

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> terhadap persentase motilitas dan membran plasma utuh sapi aceh *post-thawing*. Bahan penelitian ini menggunakan semen segar sapi aceh yang diambil menggunakan vagina buatan dan dibagi ke dalam empat perlakuan. Perlakuan kontrol (P0) semen tanpa penambahan vitamin C, perlakuan 1 (P1) semen ditambah vitamin C 0,5 g/100 ml pengencer, perlakuan 2 (P2) semen ditambah vitamin C 1,0 g/100 ml pengencer dan perlakuan 3 (P3) semen ditambah vitamin C 2,0 g/100ml pengencer. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Analisis data menggunakan uji analisis varian kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dalam medium pengencer Andromed<sup>®</sup> berpengaruh terhadap persentase motilitas dan membran plasma utuh spermatozoa sapi aceh setelah proses pembekuan. Penambahan vitamin C dosis 0,5 g/100 ml dan 1,0 g/100 ml dapat meningkatkan persentase motilitas dan membran plasma utuh spermatozoa, sedangkan penambahan vitamin C dosis 2,0 g/100 ml dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> dapat menurunkan persentase motilitas dan membran plasma utuh spermatozoa setelah pembekuan.

Kata kunci: membran plasma utuh, motilitas, sapi aceh, spermatozoa, vitamin C

## ABSTRACT

*This study aimed to determine the effect of vitamin C addition in andromed<sup>®</sup> dilution on procentage of motility and intact plasma membrane post thawing of aceh bull spermatozoa. This research used fresh semen aceh bull were collected using artificial vagina and divided into four treatments. Control treatment (P0) semen without the addition of vitamin C, first treatment (P1) semen plus vitamin C 0.5 g/100 ml of dilution, second treatment (P2) semen plus vitamin C 1.0 g/100 ml of dilution, third treatment (P3) semen plus vitamin C 2.0 g/100 ml of dilution. The experiment design used was completely randomized design (CRD). Data was analyzed using ANOVA (Analysis of Variant) and followed by Duncan's multiple range (Duncan's Multiple Range Test) 5% confidence interval. The result showed that the addition of vitamin C influence the motility and intact plasma membrane percentage of aceh bull spermatozoa after thawing. The addition of vitamin C 0.5 g/100 ml and 1.0 g/100 ml increase motility and intact plasma membrane percentage, while vitamin C 2.0 g/100 ml decrease motility and intact membrane plasma percentage after thawing.*

Key words: intact plasma membrane, motility, aceh bull, spermatozoa, vitamin C

## PENDAHULUAN

Sapi aceh merupakan salah satu jenis ternak yang banyak dikembangkan oleh masyarakat Aceh sebagai mata pencaharian. Sapi aceh meskipun tidak mempunyai laju pertumbuhan sebesar sapi silangan namun mampu menunjukkan produktivitas dan efisiensi ekonomi yang maksimal pada berbagai kondisi keterbatasan. Berdasarkan surat Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor: 2907/Kpts/OT. 140/6/2011 tanggal 17 Juni 2011, sapi aceh telah ditetapkan sebagai salah satu plasma nutfah sapi potong lokal yang ada di Indonesia selain sapi bali dan sapi madura. Berdasarkan hal tersebut, maka sapi aceh akan tetap lebih tepat dan ekonomis dikembangkan pada pola dan kondisi peternakan masyarakat aceh (Abdullah, 2007).

Sapi aceh umumnya dipelihara di kawasan Provinsi Aceh dan Sumatera Utara dengan jumlah yang tidak diketahui secara pasti. Namun, dari survei yang sudah

dilakukan Disnak Tk I Aceh, tahun 2011 diketahui bahwa opulasi sapi aceh mengalami kecenderungan penurunan dari tahun ke tahun (Disnak, 2011). Jika penurunan populasi sapi aceh ini tidak diperhatikan maka dikhawatirkan populasi sapi aceh akan terancam punah. Ancaman kepunahan sapi aceh bukan saja akibat tingginya tingkat pematangan dan rendahnya tingkat produktivitas sapi aceh, juga diakibatkan kebijakan pemerintah meningkatkan genetika sapi-sapi lokal melalui persilangan sapi pejantan unggul dengan sapi betina lokal dan aplikasi teknologi inseminasi buatan (IB) menggunakan semen beku unggul.

Berdasarkan kenyataan di atas, perlu dilakukan upaya pelestarian dan percepatan peningkatan populasi sapi aceh secara berkesinambungan melalui aplikasi bioteknologi reproduksi. Salah satu upaya mempercepat peningkatan populasi ternak sapi aceh di Provinsi Aceh dapat dilakukan melalui pemanfaatan teknologi reproduksi IB, karena dengan teknologi IB di samping mampu meningkatkan produktivitas dan

mempercepat penyebaran populasi dengan mutu genetika yang lebih baik, juga diharapkan akan dapat mengoptimalkan fungsi seekor pejantan. Namun aplikasi teknologi IB dalam pemurnian sapi aceh masih menemukan banyak kendala, terutama menyangkut penyediaan semen beku secara berkesinambungan dan belum ditemukannya metode dan bahan pengencer yang tepat untuk mempertahankan motilitas dan membran plasma utuh spermatozoa setelah pembekuan.

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel dan reaksi metaboliknya (Susilawati, 2000). Pada umumnya masalah pembekuan semen berkisar pada dua fenomena yaitu pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan intraseluler akibat pengeluaran air, yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es.

Penambahan bahan pengencer bertujuan untuk menyediakan sumber energi bagi spermatozoa sehingga menjamin kelangsungan hidup spermatozoa selama penyimpanan atau pembekuan. Syarat penting bahan pengencer spermatozoa adalah mampu menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi, mencegah terjadinya *cold shock* sewaktu penyimpanan dan pembekuan, menjaga pH dan tekanan osmotik yang sama dengan spermatozoa (Salisbury dan Van demark, 1985). Beberapa bahan pengencer telah banyak digunakan untuk meningkatkan daya hidup spermatozoa setelah pembekuan adalah Tris-kuning telur, segar-kuning telur, susu skim-kuning telur, laktosa- seperti kuning telur, dan beberapa pengencer komersial Andromed<sup>®</sup>, Bioexcell<sup>®</sup>, Trilady<sup>®</sup>, Bilady<sup>®</sup>, Biochips plus (Gil *et al.*, 2003; Rothe, 2003; Minitub Germany, 2005).

Andromed<sup>®</sup> merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar tris yang paling populer digunakan untuk pengencer semen beku sapi. Andromed<sup>®</sup> merupakan bahan pengencer komersial terdiri dari fosfolipid, tris-(hidroksimetil)-aminometan, asam sitrat, fruktosa, gliserol, tilosin tartrat, gentamisin sulfat, spektinomisin, dan linkomisin (Minitub, 2001). Penggunaan andromed<sup>®</sup> sebagai pengencer sering dikombinasikan dengan larutan NaCl atau akuades dengan perbandingan 1:4 (Herold *et al.*, 2006).

Hasil penelitian yang dilakukan Herdis *et al.* (2008), semen kerbau lumpur yang diencerkan dengan andromed<sup>®</sup> dapat mempertahankan viabilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kerbau belang setelah *thawing*. Namun penggunaan pengencer andromed<sup>®</sup> pada spermatozoa sapi aceh belum memberikan hasil fertilitas yang baik. Hasil penelitian pendahuluan, IB pada sapi aceh menggunakan *straw* sapi aceh yang dibekukan dengan pengencer andromed belum menghasilkan tingkat kebuntingan yang optimal, Hasil pemeriksaan kualitas spermatozoa, terlihat daya tahan hidup spermatozoa hasil penengerceran dengan medium andromed<sup>®</sup> rendah (*unpublished*). Kondisi tersebut diduga berkaitan dengan ketidakmampuan pengencer andromed<sup>®</sup> untuk mencegah kerusakan membran spermatozoa yang

disebabkan oleh peroksidasi lipid. Upaya untuk meminimalkan kerusakan membran spermatozoa akibat peroksidasi lipid selama proses pendinginan dapat dilakukan dengan penambahan antioksidan pada bahan pengencer.

Vitamin C (*asam arcobat*) merupakan salah satu vitamin yang bersifat sebagai anti-oksidan yang larut dalam air. Vitamin C mampu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi rantai, sehingga dapat menghindari kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap viabilitas dan fertilitas spermatozoa. Hasil penelitian Sumargono (1998) pada kerbau lumpur menunjukkan kecenderungan peningkatan viabilitas spermatozoa dengan meningkatnya dosis vitamin C dalam pengencer susi skim. Hal yang sama juga dinyatakan oleh Benconi *et al.* (1993) bahwa pengencer susu yang ditambah vitamin C dengan dosis 200 mg untuk setiap 100 ml pengencer memberi kualitas semen beku kuda yang lebih baik dibandingkan tanpa penambahan vitamin C. Sehubungan dengan hal tersebut telah dilakukan penelitian mengenai upaya peningkatan efektivitas Andromed<sup>®</sup> sebagai bahan pengencer spermatozoa sapi aceh dengan melakukan penambahan vitamin C untuk meningkatkan motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis setelah pencairan kembali (*thawing*).

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh penambahan vitamin C berbagai tingkat konsentrasi dalam pengencer dasar Andromed<sup>®</sup> untuk meningkatkan persentase motilitas dan membrane plasma utuh spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi lebih lanjut tentang pengembangan pengenceran semen dengan penambahan vitamin C sebagai bahan pelindung terhadap reaksi peroksidasi lipid yang dapat merusak membran sel, sehingga dapat mempertahankan kualitas semen sapi aceh selama proses pembekuan.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola searah dengan 4 kelompok perlakuan penambahan vitamin C (P0=0,00 g/100 ml; P1=0,50 g/100 ml; P2=1,00 g/100 ml; dan P3= 2,00 g/100 ml) pengencer dalam pengencer dasar Andromed<sup>®</sup>, tiap kelompok diulang sebanyak 3 kali.

### Pemeliharaan Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan 2 ekor sapi aceh jantan dewasa berumur antara 4-5 tahun dengan berat badan 350-400 kg. Tiga bulan sebelum penelitian dilaksanakan, sapi tersebut diberi kesempatan penyesuaian diri terhadap lingkungan setempat. Sapi tersebut dikandangkan pada kandang individual yang dilengkapi dengan tempat makan dan minum. Pemberian pakan hijauan segar sebanyak dua kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari sebanyak 10 persen dan konsentrat sebanyak 1 persen per ekor dari berat badan per hari. Air minum diberikan secara *ad libitum*.

### Penampungan Semen

Sampel semen yang akan digunakan diambil dari 1 ekor pejantan sapi aceh jantan, sehat berumur 4-5 tahun dengan cara penampungan menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan pada pagi hari jam 8.00- 9.00 WIB, sebanyak 1 kali dalam seminggu. Prosedur penampungan semen dilakukan berdasarkan metode yang biasa dilakukan pada Balai Inseminasi Buatan Lembang.

Segera setelah penampungan semen dilakukan pemeriksaan kualitas semen secara makroskopis (volume, warna, konsistensi, bau, dan pH) dan mikroskopis (konsentrasi spermatozoa, persentase motilitas spermatozoa, spermatozoa hidup, spermatozoa abnormalitas, dan membran plasma spermatozoa utuh). Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa  $>600 \times 10^6/\text{ml}$  dan motilitas progresif  $>70\%$ , abnormalitas  $<20\%$  digunakan sebagai sampel.

### Pengenceran Semen dan Pengisian Semen ke dalam Straw

Segera setelah dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen segar, semen dibagi dalam 4 kelompok perlakuan pengencer Andromed<sup>®</sup> yang telah ditambahkan vitamin C berbagai konsentrasi. Jumlah bahan pengencer yang akan ditambahkan ke masing-masing semen dihitung dengan rumus:

$$\text{Vol. Pengencer} = \frac{\text{Vol. semen} \times \text{Kons. Sperma} \times \text{Motilitas}}{\text{Kons. Sperma yang diinginkan /ml}}$$

Volume masing-masing pengenceran yang pertama kali ditambahkan pada semen sesuai dengan volume semen yang diperoleh. Selanjutnya ditambahkan sedikit demi sedikit sampai volume yang diinginkan terpenuhi. Konsentrasi semen yang diinginkan adalah 100 juta spermatozoa/ml atau 25 juta/*straw*. Prosedur pengencer dan pengemasan sesuai dengan yang dianjurkan oleh Balai Inseminasi Buatan Lembang, Bandung.

### Equilibrasi, Pembekuan, dan Thawing Semen

Semen yang telah diencerkan dan dikemas di dalam *straw* mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 25 juta sperma motil per *straw*, kemudian diekuilibrasi di dalam *cool top* bersuhu  $5^\circ\text{C}$  selama 4 jam. Selanjutnya *straw* diletakkan di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar  $-110^\circ\text{C}$ ) setinggi 2-3 cm selama 10-12 menit. Kemudian *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu  $-196^\circ\text{C}$ ) dan disimpan dalam kontainer. Setelah disimpan, masing-masing sampel spermatozoa beku dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. *Thawing* dilakukan dengan cara memasukkan *straw* ke dalam air bersuhu  $37^\circ\text{C}$  (di dalam penangas air) selama 30 detik. Parameter kualitas spermatozoa yang diamati adalah persentase motilitas, dan persentase integritas membran plasma utuh (MPU) masing-masing setelah tahap pengenceran, ekuilibrasi dan pencairan kembali (*thawing*).

### Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa

#### Pemeriksaan motilitas spermatozoa

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan menurut standar baku Balai Inseminasi Buatan Singosari (Zenichero *et al.*, 2002). Perhitungan motilitas spermatozoa dilakukan menggunakan gelas obyek yang ditetesi 10-15  $\mu\text{l}$  semen dan tutup dengan gelas penutup. Siapan diperiksa dengan pembesaran 400 kali menggunakan mikroskop elektrik yang dihubungkan dengan layar monitor. Spermatozoa yang motil akan nampak bergerak maju ke depan. Selanjutnya spermatozoa yang motil dihitung dan diberi jumlah seluruh spermatozoa yang tampak dalam satu lapangan pandang, dan dinyatakan dalam persen (%). Pengamatan dilakukan sebanyak 5 lapangan pandang atau jumlah total spermatozoa minimal 100-200 sperma.

#### Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa

Pemeriksaan membran plasma utuh spermatozoa dilakukan berdasarkan uji pembengkakan atau *hypoosmotik swelling test* (HOS-Test) sebagaimana yang dikembangkan oleh Rasul *et al.* (2001). Sebanyak 0,1 ml suspensi sperma hasil pencucian ditambahkan ke dalam 0,9 ml larutan hypoosmotik 0,032 M (yang dibuat dari 7,35 g Na Citrat  $2\text{H}_2\text{O}$ , 13,52 g NaCl yang dilarutkan dalam 1 liter aquadest) dan diinkubasikan selama 1 jam di dalam inkubator pada suhu  $37^\circ\text{C}$ , selanjutnya dibuat preparat ulas tipis dengan mencampurkan 1 tetes larutan di atas dengan 1 tetes eosin nigrosin, diamati dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400X. Spermatozoa dihitung dengan cara berurutan sampai 5 lapang pandang atau jumlah spermatozoa 100-200. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan adanya pembengkakan kepala yang diikuti dengan ekor berputar dengan pancaran warna terang, sedangkan spermatozoa yang membran plasmanya sudah rusak ditandai dengan tidak ada pembengkakan kepala dan ekor yang lurus.

#### Analisis Data

Data persentase motilitas dan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varian dan dilanjutkan dengan uji berganda Duncan (Steel dan Torrie, 1990).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kualitas Semen Segar

Kualitas spermatozoa segera sebelum proses pembekuan sangat menentukan keberhasilan pelaksanaan pembekuan semen. Kualitas semen dan spermatozoa yang diukur pada penelitian ini meliputi volume, warna, konsistensi, gerakan massa, derajat keasaman (pH), konsentrasi, persentase motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan persentase abnormalitas spermatozoa. Hasil pemeriksaan kualitas semen segar sapi aceh dari 3 kali ejakulat kedua pejantan yang digunakan disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Rata-rata ( $\pm$ SD) kualitas semen segar sapi aceh setelah koleksi

Parameter	Hasil Pengamatan
Volume (ml)	4,13 $\pm$ 0,35
Warna	Krem keputihan
Konsistensi	Kental
Gerak massa	+++
pH	6,93 $\pm$ 0,12
Motilitas (%)	78,33 $\pm$ 2,89
Konsentrasi (10 <sup>6</sup> / ml)	1.076 $\pm$ 126,62
Spermatozoa hidup (%)	89,33 $\pm$ 2,52
Abnormalitas (%)	7,33 $\pm$ 1,53
Integritas membran (%)	86,33 $\pm$ 2,52

Berdasarkan hasil penilaian semen segar pada Tabel 1, dapat disimpulkan bahwa semen segar sapi aceh yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kategori baik dan memenuhi syarat untuk digunakan sebagai sampel semen untuk dibekukan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Toelihere (1985) dan Balai Inseminasi Buatan Dirjen Peternakan bahwa terdapat beberapa persyaratan yang harus dipenuhi dalam proses pendinginan atau pembekuan semen adalah perkiraan motilitas minimal 70%, konsentrasi lebih dari 2.000 juta per ml semen dan abnormalitas tidak kurang dari 20%, persentase hidup spermatozoa minimal 75%, abnormalitas tidak lebih dari 20%, dan semen memiliki gerakan massa ++/+++.

**Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan**

Motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa sesudah proses pembekuan selalu digunakan sebagai pegangan yang termudah dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan dengan semen cair. Daya gerak progresif ini mempunyai peranan yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Kecepatan gerakan spermatozoa untuk masing-masing spesies berbeda dan bervariasi sesuai dengan kondisi medium dan suhu lingkungan (Toelihere, 1985). Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah proses pembekuan pada keempat kelompok perlakuan penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> disajikan pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah dilakukan pengenceran dengan pengencer andromed<sup>®</sup> tanpa penambahan vitamin C relatif tidak berubah dibandingkan dengan penambahan vitamin C berbagai tingkat dosis. Hasil ini mengindikasikan bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> dengan konsentrasi 0,5 g/100 ml; 1,0 g/100 ml dan 2,0

g/100 ml tidak merubah kondisi fisiologis pengencer.

Hasil analisis statistik menggunakan analisis varian pola satu arah menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> tidak berbeda secara nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap persentase motilitas spermatozoa. Fakta ini mengindikasikan bahwa penambahan vitamin C dengan berbagai konsentrasi (0,5 g/100 ml; 1,0 g/100 ml dan 2,0 g/100 ml) dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> tidak merubah kondisi fisiologis pengencer, sehingga masih cocok dengan kondisi fisiologis spermatozoa sapi aceh. Keadaan ini juga menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> belum memengaruhi metabolisme dan fisiologis spermatozoa.

Setelah dilakukan ekuilibrasi dalam *cool top* pada suhu 5° C selama 4 jam terlihat bahwa persentase motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan penambahan vitamin C dalam medium Andromed<sup>®</sup> lebih tinggi dibandingkan dengan tanpa penambahan vitamin C. Hasil ini membuktikan bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed berpengaruh terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi selama 4 jam. Persentase motilitas spermatozoa pada kelompok penambahan vitamin C 1,00 g/100 ml pengencer (P2) lebih tinggi secara nyata ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok tanpa penambahan vitamin (P0) dan penambahan vitamin 2,00 g/100 ml pengencer (P3), namun tidak berbeda secara nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok penambahan vitamin C 0,5 g/100 ml pengencer (P1). Persentase spermatozoa pada kelompok P2 lebih tinggi secara nyata ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan P0 dan P3 sedangkan perlakuan P3 lebih rendah secara tidak nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan P0. Fakta ini membuktikan bahwa selama proses ekuilibrasi pada suhu 5° C selama 4 jam sudah terjadi interaksi antara komponen-komponen pengencer semen dengan spermatozoa. Selain itu komponen pengencer semen termasuk vitamin C sudah memengaruhi metabolisme dan kondisi fisiologis spermatozoa

Hasil yang sama juga diperoleh pada pengamatan setelah proses pembekuan dan pencairan kembali, persentase motilitas spermatozoa pada kelompok penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> berpengaruh secara nyata ( $P < 0,05$ ). Persentase motilitas spermatozoa pada kelompok P1 lebih tinggi secara nyata ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan P0 dan P3, namun lebih tinggi secara tidak nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan P2. Persentase motilitas spermatozoa pada P2 lebih tinggi secara nyata ( $P < 0,05$ )

**Tabel 2.** Rata-rata ( $\pm$  SD) persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah pengenceran sampai pencairan kembali berdasarkan tingkat konsentrasi penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup>

Perlakuan	Persentase Motilitas Spermatozoa		
	Setelah Pengenceran	Setelah Ekuilibrasi	Setelah Pembekuan
P0 (0,00 g/100 ml)	75,59 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	64,95 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	36,4 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>
P1 (0,50 g/100 ml)	77,44 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	67,99 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>	40,16 $\pm$ 3,50 <sup>a</sup>
P2 (1,00 g/100 ml)	78,08 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	67,19 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	38,96 $\pm$ 5,09 <sup>a</sup>
P3 (2,00 g/100 ml)	76,66 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	61,80 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	30,19 $\pm$ 2,60 <sup>b</sup>

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

dibandingkan dengan P0 dan P3. Persentase motilitas spermatozoa pada P3 lebih tinggi secara tidak nyata ( $P > 0,05$ ) dibandingkan dengan P0. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa penambahan vitamin C konsentrasi 0,5 g/100 ml dan 1,00 g/100 ml pengencer dalam pengencer Andromed mampu meningkatkan persentase motilitas spermatozoa setelah proses pembekuan. Fakta tersebut menunjukkan bahwa penambahan vitamin C dengan konsentrasi 0,5-1,00 g/100 ml dapat memperbaiki komposisi dan kondisi fisiologis pengencer. Keadaan tersebut diduga karena dengan penambahan vitamin C 0,5- 1,00 g/100 ml pengencer terjadi optimalisasi laju fruktolisis sehingga kebutuhan energi untuk motilitas dan kelangsungan hidup dapat terpenuhi. Selain itu, diduga vitamin C dapat mengikat oksigen radikal yang terdapat di dalam sel, sehingga dapat mencegah terbentuknya peroksidasi lipid yang dapat menghambat glikolisis dan motilitas. Chinoy *et al.* (1991) melaporkan bahwa pemberian vitamin C yang dikombinasikan dengan kalsium ternyata dapat mempertinggi kadar  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  serta aktivitas ATPase dan suksinat dehidrogenase, sehingga mengakibatkan terjadinya peningkatan metabolisme energi spermatozoa. Vitamin C berperan dalam sistim oksidasi reduksi yang dikopel dengan glutation, sitokrom C dan plavin nukleotida (Combs, 1992). Hidrosinonenal (HNE) merupakan salah satu peroksidasi lipid yang dapat menghambat glikolisis dan motilitas spermatozoa. Penghambatan motilitas oleh HNE diduga berkaitan dengan penghambatan glikolisis dan oksidasi gugus sulfhidril (-SH) dari protein mikrotubul ekor spermatozoa. Vitamin C merupakan salah satu antioksidan yang dapat mengikat senyawa-senyawa radikal sehingga dapat mencegah terbentuknya peroksidasi lipid (Aurich *et al.*, 1997).

Hasil penelitian ini juga membuktikan bahwa penambahan vitamin C yang lebih tinggi (2,00 g/100 ml pengencer) dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> justru menurunkan motilitas spermatozoa setelah pendinginan. Fakta tersebut mengindikasikan bahwa penambahan vitamin C ke dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> hanya dapat dilakukan dengan konsentrasi tidak melebihi 1,00 g/100 ml. Rendahnya motilitas pada penambahan 2,00 g/100 ml diduga disebabkan karena terjadinya penurunan pH pengencer sehingga tidak sesuai lagi dengan kondisi fisiologis spermatozoa. Menurut Sumargono (1998) motilitas dan integritas spermatozoa kerbau lumpur menurun dengan penambahan vitamin C yang tinggi (3-5 mMolar pengencer) disebabkan karena menurunnya pH pengencer. Penurunan pH di lingkungan sel akan menyebabkan terjadinya gangguan terhadap kerja enzim-enzim metabolisme (Lehninger, 1982).

Penurunan persentase motilitas spermatozoa seiring dengan tahapan pembekuan mulai dari pengenceran, ekuilibrasi dan pembekuan. Rataan tingkat penurunan persentase motilitas spermatozoa pada tiap perlakuan tidak sama, dan terlihat bahwa semen pada kelompok penambahan vitamin C 0,50-1,00 g/100 ml pengencer masih memperlihatkan persentase motilitas layak IB

hingga pencairan kembali, sedangkan semen dalam pengencer andromed yang ditambah vitamin C 2,00 g/100 ml pengencer diperoleh persentase motilitas spermatozoa di bawah persentase layak IB yaitu ( $32,67 \pm 1,53$ ).

Penurunan persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan disebabkan oleh semakin sedikitnya spermatozoa yang memiliki cadangan energi yang cukup untuk digunakan bergerak, karena spermatozoa yang telah mengalami cekaman dingin dapat mengalami destabilisasi membran. Destabilisasi membran akan meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion-ion, termasuk ion kalsium sehingga akan berakibat terhadap meningkatnya ion kalsium dalam sitosol yang diikuti dengan meningkatnya ion kalsium dalam mitokondria. Meningkatnya konsentrasi ion kalsium dalam mitokondria ini akan menurunkan sintesa ATP sehingga cadangan energi yang dapat digunakan untuk motilitas spermatozoa akan menurun (Hafez, 2004). Selain itu, pembekuan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam. Kondisi ini dapat bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa (Suharyati, 2011). Proses *cooling*, *freezing*, dan *thawing* sangat mempengaruhi stabilitas dan fungsi-fungsi hidup sel membran. Penurunan kualitas spermatozoa diatas terjadi karena adanya kerusakan struktur membran selama pendinginan sehingga proses metabolisme spermatozoa terganggu (Susilawati, 2000).

### **Persentase MPU Spermatozoa Sapi Aceh setelah Pembekuan**

Integritas membran plasma merupakan suatu keadaan membran plasma yang harus tetap terjaga keutuhannya untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa, motilitas dan kemampuan fertilisasi. Hal ini disebabkan karena membran plasma berfungsi sebagai pembatas sel kontineus, yang melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik dan mengatur lalu lintas keluar masuknya zat-zat makanan serta ion-ion yang diperlukan dalam proses metabolisme. Kerusakan pada membran plasma mengakibatkan terganggunya proses metabolisme dan proses fisiologis, sehingga menyebabkan kematian pada spermatozoa (Rasul *et al.*, 2001).

Rata-rata persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi aceh yang diamati dengan metode *HOS-test* pada pengencer Andromed<sup>®</sup> dengan penambahan vitamin C disajikan pada Tabel 3.

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa rata-rata MPU spermatozoa sapi aceh yang diencerkan dalam pengencer andromed<sup>®</sup> dengan penambahan vitamin C berbagai konsentrasi mengalami penurunan selama proses pembekuan. Penurunan persentase MPU terlihat dari tahap pengenceran, ekuilibrasi sampai setelah pembekuan dan pencairan kembali. Rendahnya angka persentase MPU spermatozoa setelah pencairan kembali dalam berbagai bahan pengencer kemungkinan

**Tabel 3.** Rata-rata ( $\pm$  SD) persentase integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi aceh setelah pengenceran sampai pencairan kembali berdasarkan tingkat konsentrasi penambahan vitamin C dalam pengencer andromed<sup>®</sup>

Perlakuan	Persentase MPU Spermatozoa		
	Setelah Pengenceran	Setelah Equilibrasi	Setelah Pembekuan
P0 (0,00 g/100 ml)	77,27 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	62,03 $\pm$ 3,117 <sup>a</sup>	38,00 $\pm$ 5,26 <sup>b</sup>
P1 (0,50 g/100 ml)	79,91 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>	67,84 $\pm$ 4,04 <sup>b</sup>	42,65 $\pm$ 5,34 <sup>a</sup>
P2 (1,00 g/100 ml)	79,49 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>	67,87 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>	39,33 $\pm$ 5,70 <sup>a</sup>
P3 (2,00 g/100 ml)	77,83 $\pm$ 2,27 <sup>a</sup>	62,59 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	32,48 $\pm$ 1,17 <sup>b</sup>

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

disebabkan oleh terjadinya perubahan polaritas pengencer. Kondisi ini akan memengaruhi stabilitas membran spermatozoa yang akan berakibat bertambahnya kematian sel. Selama proses pembekuan terjadi depolarisasi atom-atom atau molekul-molekul penyusun membran yang mengakibatkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran (Kelso *et al.*, 1997). Selanjutnya Gunawan. (1998) menyatakan bahwa ada beberapa hal yang menyebabkan kematian sel spermatozoa sehubungan dengan destabilisasi membran, diantaranya adanya perubahan susunan membran terutama susunan fosfolipid penyusun membran akibat cekaman dingin atau pembekuan.

Pada pengamatan setelah pengenceran, penambahan vitamin C (0,00; 0,50; 1,00 dan 2,00 g/100 pengencer) dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> tidak memberikan pengaruh yang nyata ( $P>0,05$ ) terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh. Fakta ini mengindikasikan bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> tidak memengaruhi metabolisme dan fisiologis spermatozoa. Kondisi ini sesuai dengan yang dilaporkan Situmorang (2002) bahwa setelah pengenceran tidak ada perubahan yang nyata pada kualitas spermatozoa.

Namun setelah dilakukan ekuilibrasi selama 4 jam terlihat bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> berpengaruh terhadap persentase MPU spermatozoa. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok P1 lebih tinggi secara nyata ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan P0 dan P3, namun lebih tinggi secara tidak nyata ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan dan P2. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok P2 lebih tinggi secara nyata ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan P0 dan P3, sedangkan persentase MPU pada kelompok P3 lebih tinggi secara tidak nyata ( $p>0,05$ ) dibandingkan dengan P0. Fakta ini membuktikan bahwa setelah ekuilibrasi selama 4 jam pada suhu 5° C sudah terjadi interaksi antara komponen-komponen bahan pengencer semen dengan spermatozoa.

Hal yang sama juga terlihat pada pengamatan setelah pembekuan, penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> berpengaruh secara nyata ( $P<0,05$ ) terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh. Persentase MPU spermatozoa pada kelompok P1 lebih tinggi secara nyata ( $p<0,05$ ) dibandingkan dengan P0 dan P3, akan tetapi lebih tinggi secara tidak nyata ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan P2. Persentase MPU spermatozoa pada P2 lebih tinggi secara nyata ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan P0 dan P3, sedangkan perlakuan

P3 lebih tinggi secara tidak nyata ( $P>0,05$ ) dibandingkan dengan P0.

Hasil penelitian ini sedikit berbeda dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Sumargono (1998) pada spermatozoa kerbau lumpur yang diencerkan dengan tris kuning telur dengan penambahan vitamin C 0,40 g/100 ml setelah pembekuan, yang memperoleh persentase MPU spermatozoa sebesar 54,20 $\pm$ 3,95% setelah pencairan kembali. Adanya perbedaan persentase MPU spermatozoa yang ditemukan ini, kemungkinan disebabkan oleh perbedaan jenis hewan, umur, pola pemeliharaan, dan bahan pengencer yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan semen yang diperoleh dari sapi aceh umur 4-5 tahun, dengan pola pemeliharaan yang dikandangkan secara individu. Pakan yang diberikan adalah campuran hijauan yang dilengkapi dengan konsentrat. Hal ini sesuai dengan pernyataan yang dilaporkan Toelihere (1985) bahwa kualitas spermatozoa dipengaruhi oleh spesies, jenis, umur, pola pemeliharaan dan bahan pengencer yang digunakan.

Tingginya persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> pada proses pembekuan berhubungan dengan kemampuan vitamin C dalam menghambat terjadinya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa sebagai akibat meningkatnya senyawa oksigen reaktif dalam pengencer selama proses pembekuan. Sebagaimana dilaporkan Widjaya (1995) bahwa vitamin C merupakan salah satu vitamin yang bersifat sebagai anti oksidan larut dalam lemak yang mampu menghambat aktivitas senyawa oksigen reaktif dan mencegah terjadinya reaksi berantai antara senyawa oksigen reaktif dengan asam lemak tak jenuh majemuk yang terdapat pada membran plasma spermatozoa. Vitamin C juga mampu bekerja di dalam dan di luar dinding sel sehingga dapat mengurangi atau mencegah peroksidasi lipid secara lebih luas (Suryohudoyo, 2000; Aitken *et al.*, 1993). Dengan demikian dapat dibuktikan bahwa penambahan vitamin C di dalam pengencer pada proses pembekuan dapat mempertahankan dan melindungi membran sel spermatozoa sapi aceh dari serangan senyawa oksigen reaktif.

## KESIMPULAN

Penambahan vitamin C dalam pengencer Andromed<sup>®</sup> dapat meningkatkan motilitas dan MPU spermatozoa sapi aceh setelah proses pembekuan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A. 2008. Karakterisasi Genetik Sapi Aceh Menggunakan Analisis Keragaman Fenotipik, Daerah D-Loop DNA Mitokondria dan DNA Mikrosatelit. **Disertasi**, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Aitken R.J., D. Harkiss, and D.W. Buckingham 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. **Mol. Reprod. Deff.** 35:302-315.
- Aurich, J.E., U. Schoneher, H. Hoppe, and C. Aurich. 1997. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology.** 48:185-192
- Benconi, M.T., C.R. Francia, N.G. Mora, and M.A. Affranchino. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservations. **Theriogenology.** 40:841-851.
- Chinoy, N.J., E. Sequeirina, and M.V. Narayana. 1991. Effects of vitamin C and calcium on the reversibility of fluoride-indecute alterations in spermatozoa of the rabbits. **Florida.** 24:29-39.
- Combs, F.G. 1992. **The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health.** Academic Press Inc., New York.
- Gil, J., N. Lundeheim, L. Soederquist, and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology.** 59(5-6):1241-1255.
- Gunawan. 1998. Upaya Peningkatan Mutu Genetik Sapi Aceh. **Orasi Ilmiah.** Pidato Pengukuhan dalam Jabatan Guru Besar Tetap Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala. Disampaikan pada Rapat Senat Terbuka Universitas Syiah Kuala, Sabtu, 28 Maret 1998, Banda Aceh.
- Hafez, E.S.E. 2004. X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa. In **Reproduction in Farm Animal.** 8<sup>th</sup> ed. Lea & Febiger Philadelphia, USA.
- Herdis, M. Surachman, Yulnawati, M. Rizal dan H. Maheshwari. 2008. The viability and membrane integrity of spotted buffalo epididymal sperm in addition of maltose into andromed extender. **J. Indon. Trop. Anim. Agric.** 33(2):75-82.
- Herold, F.C., K. de Haas, B. Colenbrander, and D. Gerber. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using triladylä or andromedä. **Theriogenology.** 66:1123-1130.
- Kelso, K.A., A. Redpath, R.C. Noble, and B.K. Speake. 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bull. **J. Reprod. Fertil.** 109:1-9.
- Lehninger, A.L. 1982. Dasar-dasar Biokimia. Jilid I. (Terjemahan Maggy Thenawidjaja). Erlangga, Jakarta.
- Minitub. 2001. **Certificate Andromed.** Minitub Abfullund Labortechnik GmbH & Co KG. Germany.
- Minitube Germany. 2005. Bovine Artificial Incemination. **www.minitube.de**
- Rasul, Z., N. Ahmad, dan M. Nazar. 2001. Changes in motion characteristic. Plasma membran integrity and acrosom morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. **J. Biol. Reprod.** 65:217-224.
- Rothe, N.H.I. 2003. Insemination of Cryopreserved Bull Semen Portion with Sperm Number after Dilution Two Egg-Yolk Free Extenders. **Proceeding European AI Vets Meeting Cattle Session, Budapest:**14-23.
- Salisbury, G.W., N.L. Vandemark, dan R. Djanuar. 1985. **Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi.** Gadjah Mada Universitas Press, Jogjakarta
- Steel, R.G.D. dan G. Torrie, 1990. **Prinsip dan Prosedur Statistika. Suatu Pendekatan Biometrik.** PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Suharyati, S. dan M. Hartono. 2011. Preservasi dan riopreservasi semen sapi limousin dalam berbagai bahan pengencer. **J. Kedokteran Hewan.** 5(2):72-76.
- Sumargono, T. 1998. Peningkatan Kualitas Spermatozoa Kerbau Lumpur Dengan Penambahan Asam Ascorbat dalam Pengencer Semen Beku. **Tesis.** Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Suryohudoyo, P. 2000. **Ilmu Kedokteran Molekuler.** Edisi ke-1. CV. Sagung Seto, Jakarta.
- Susilawati, 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. **Disertasi.** Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. **Disertasi.** Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Toelihere, M.R. 1985. **Fisiologi Reproduksi pada Ternak.** Penerbit Angkasa, Bandung.
- Wijaya, A. 1995. **Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan.** Forum Diagnostikum Prodia Diagnostics Education Services, Jakarta.
- Zenichiro. K. Herlantien, Sarastina. 2002. **Intruksi Praktis Teknologi Processing Semen Beku pada Sapi.** JICA- BIB Singosari, Malang