

**PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGECER SITRAT KUNING
TELUR TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE HIDUP DAN ABNORMALITAS
SPERMATOZOA SAPI ONGOLE**

*The Effect of Addition Rafinosa Dose in Diluent Citric Yolk to Motility, Percentage of Live and
Abnormalities Spermatozoa Ongole Cattle*

Sintha Pubiandara^a, Sri Suharyati^b, Madi Hartono^b

^aThe Student of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

^b The Lecture of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture Lampung University

Soemantri Brojonegoro No.1 Gedong Meneng Bandar Lampung 35145

e-mail : sinthapubiandara@gmail.com

ABSTRACT

The research which was conducted in the Regional Technical Services Unit Lampung Regional Artificial Insemination Centres, Regency Terbanggi Besar, Central Lampung Regency, Lampung Province on 19-20 May 2016, aims to determine the effect of dose rafinosa in egg yolk citrate diluents on motility, percentage of live sperm and abnormal spermatozoa Ongole. The experimental used is completely randomized design with 6 treatments rafinosa dose (0.5%; 1%; 1.5%; 2%; 2.5%; 3%) in the egg yolk citrate diluent and each treatment be repeated 4 times. The data obtained were analyzed using analyzed variety at significance level of 5% or 1% then for variables that significantly undergone orthogonal polynomial test to determine the optimum dose rafinosa. The results showed that the addition of a diluent doses rafinosa in egg yolk citrate is not significantly different ($P > 0.05$) on the percentage of live sperm in prefreezing and post thawing motility; on motility and sperm abnormalities in the equilibration, prefreezing and PTM. Extra doses of raffinose in egg yolk citrate highly significant ($P < 0.01$) on the percentage living on equilibration spermatozoa patterned quadratic. Found that the addition rafinosa at equilibration was highly significant ($P < 0.01$) to live spermatozoa with $\bar{Y} = 66.49 + 17,94x - 4,23x^2$ with the optimum value of 2.1%.

Keywords: Rafinose , Motility, Percentage of Live, Abnormal Spermatozoa, Ongole Cattle

PENDAHULUAN

Sapi Ongole merupakan sapi yang berasal dari India dan diperhitungkan sebagai ternak tertua yang dijinakkan di dunia (Burhan, 2003). Sapi Ongole memiliki banyak keunggulan dibandingkan dari jenis lain yaitu mampu bertahan terhadap panas serta endoparasit dan ektoparasit, mampu beradaptasi terhadap pakan yang buruk serta pertumbuhan yang relatif cepat dengan presentase karkas yang baik. Pertumbuhan sapi Ongole yang relatif cepat dapat membantu mempercepat peningkatan populasi sapi Ongole sehingga dapat memenuhi kebutuhan daging di Indonesia.

Populasi sapi Ongole dapat ditingkatkan dengan perbaikan genetik yang dapat dilakukan dengan cara pemanfaatan teknologi reproduksi yaitu perkawinan suntik atau inseminasi buatan (IB) dengan semen beku. Semen beku yang digunakan untuk IB harus memiliki kualitas

yang baik karena diambil dari pejantan unggul yang telah melalui seleksi terlebih dahulu.

Kualitas sperma tidak hanya dipengaruhi oleh bibit dari pejantan tetapi juga dipengaruhi oleh pengenceran semen. Pengenceran merupakan cara yang dapat dilakukan untuk mempertahankan kualitas dan volume sperma selama penyimpanan. Menurut Toelihere (1993), penggunaan bahan pengencer semen harus mempertahankan viabilitas spermatozoa sebelum digunakan pada waktunya. Pengencer semen juga harus memungkinkan spermatozoa bergerak secara progresif, tidak bersifat racun terhadap spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*).

Pengencer yang sering digunakan untuk pengenceran semen adalah Tris-kuning telur, sitrat-kuning telur, susu segar-kuning telur, susu skim-kuning telur, AndroMed[®], dan laktosa-kuning telur. Sitrat kuning telur memiliki keunggulan yaitu mengandung lecitin

dan lippoprotein yang dapat digunakan sebagai bahan penyangga (*buffer*) yang dapat mempertahankan dan mengatur pH semen juga mencegah terjadinya *cold shock* akibat penurunan temperatur yang mendadak. Pengencer sitrat kuning telur juga mengandung karbohidrat yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi bagi spermatozoa. Penambahan karbohidrat dapat berfungsi sebagai nutrisi yang dapat digunakan oleh spermatozoa untuk melakukan aktivitas fisiologisnya sebelum spermatozoa dideposisikan ke alat kelamin betina.

Penambahan rafinosa pada pengencer semen dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama (Savitri, 2014). Sampai saat ini belum dilakukan penelitian tentang penambahan dosis rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur sehingga dilakukan penelitian dengan menambahkan rafinosa.

MATERI DAN METODE

Materi

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: vagina buatan, tabung penampung berskala, labu didih dan penangas, timbangan elektrik, spatula, corong, gelas ukur dan tutupnya, kertas label, kertas *whatman*, *waterbath erlenmeyer*, tabung reaksi, pipet tetes, *cold top*, *incubator*, *container*, gunting, pinset, kertas tisu, *stopwatch*, thermometer, ember, mikroskop, *spektrofotometer*, *micropipet*, mesin *filling and sealing*, pH meter, *boks* tempat *prefreezing*, *counter number*, alat hitung, gelas kaca, gelas penutup, kamera, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: semen sapi Ongole, sitrat kuning telur, Na-sitrat, *aquabidestilata*, telur ayam, antibiotik *penicillin* 1000 IU, *streptomycin* 1 ml, alkohol 70%, fruktosa, rafinosa, pewarna eosin 2% dan nitrogen cair.

Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam kali perlakuan penambahan dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur semen Sapi Ongole. Setiap perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan. Perlakuan yang dicobakan adalah konsentrasi rafinosa sebagai berikut:

R1 : penambahan rafinosa 0,5% dalam bahan pengencer;

R2 : penambahan rafinosa 1 % dalam bahan pengencer;

R3 : penambahan rafinosa 1,5% dalam bahan pengencer;

R4 : penambahan rafinosa 2% dalam bahan pengencer;

R5 : penambahan rafinosa 2,5% dalam bahan pengencer;

R6: penambahan rafinosa 3% dalam bahan pengencer.

Metode

Semen sapi Ongole ditampung dengan menggunakan vagina buatan. Semen segar yang diperoleh kemudian dievaluasi secara makroskopis (volume, warna, kekentalan pH, dan bau) dan mikroskopis (motilitas, konsentrasi, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa). Semen segar yang memenuhi syarat diencerkan sesuai dengan perlakuan yang diberikan.

Pembuatan Sitrat Kuning telur terdiri dari 2 tahapan, yaitu pembuatan *buffer* dan pembuatan pengencer, kemudian larutan *buffer* dicampurkan dengan larutan pengencer. Larutan yang telah tercampur dibagi menjadi 6 dengan masing-masing 10 ml lalu tiap bagian ditambahkan dengan dosis rafinosa yang berbeda yaitu 0,5%; 1 %; 1,5%; 2%; 2,5% dan 3%.

Setelah diencerkan, semen di ekuilibrasikan didalam *cold top* dengan suhu $\pm 5^{\circ}\text{C}$ selama 4 jam, kemudian dikemas kedalam *straw* yang berukuran 0,25 ml. Proses *Prefreezing* semen dilakukan dengan menempatkan *straw* pada rak di dalam uap nitrogen cair sekitar 10 cm diatas permukaan nitrogen cair selama 10 menit. *Freezing* di lakukan didalam kontainer yang berisi nitrogen cair dengan suhu -196°C . Pencairan kembali (*thawing*) di lakukan dengan memasukan *straw* pada air yang bersuhu 37°C selama 30 detik.

Guna mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kualitas semen beku, dilakukan evaluasi pada tahap ekuilibrasasi, setelah *prefreezing* dan *post thawing motility*.

Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah :

1. Motilitas
menentukan motilitas spermatozoa sesuai dengan kriteria 0--100%
2. Persentase spermatozoa hidup(%)
dihitung dengan rumus:

$$= \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100 \%$$

3. Abnormalitas (%) dihitung dengan:
 Dihitung dengan rumus:

$$= \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah spermatozoa keseluruhan}} \times 100 \%$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1% dilanjutkan dengan uji *Polinomial Ortogonal* (Steel dan Torrie 1993) untuk peubah yang berpengaruh nyata.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi Ongole

Semen segar yang digunakan pada penelitian ini menggunakan semen dari pejantan sapi Ongole berumur 6 tahun. Semen segar yang diperoleh dinilai secara makroskopis (volume, bau, pH, konsistensi, dan warna) dan mikroskopis (motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, persentase spermatozoa hidup dan abnormalitas spermatozoa). Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa semen yang diperoleh dari pejantan Ongole cukup baik sehingga dapat dilakukan proses selanjutnya. Hasil pemeriksaan semen segar disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segar sapi Ongole

Parameter	Nilai
Volume (ml)	5
Warna	Putih susu
Bau	Khas
Konsistensi	Kental
pH	6
Motilitas Massa	+++
Motilitas Individu (%)	75
Konsentrasi (juta/ml)	2.124
Spermatozoa Hidup (%)	86,5
Abnormalitas (%)	0,7

Keterangan : +++ = sangat baik; terlihat seperti gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif.

Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa semen yang tertampung sebanyak 5 ml. Hasil ini sesuai dengan pendapat Feradis (2010) yang menyatakan bahwa volume semen sapi berkisar 5--8 ml/ejakulasi. Toelihere (1993) menambahkan bahwa volume semen sapi berkisar 1--15 ml/ejakulasi.

Warna semen yang tertampung pada penelitian ini adalah putih susu, hal tersebut sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) dan Affandy *et al.*,(2007) yang menyatakan bahwa warna semen pada sapi yaitu putih susu dan

krem. Pada semen normal yang tertampung mempunyai bau yang khas, serta memiliki konsistensi yang kental, hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993). Derajat keasaman atau pH semen yang tertampung adalah 6. pH semen segar berkisar antara 6,4--7,8 (Butar, 2009; Nalbandov, 1990; Toelihere, 1985).

Motilitas massa semen segar dari pejantan sapi Ongole yang ditampung adalah +++ yang berarti semen tersebut baik karena terlihat seperti gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif bertenaga sesuai dengan pendapat (Toelihere, 1985). Motilitas individu semen yang tertampung sebesar 75% bergerak progresif, motilitas individu tersebut masih dalam kisaran normal sesuai dengan pendapat Hafez (2000) yang menyatakan bahwa motilitas semen segar sapi sebesar 70%. Konsentrasi semen segar yang ditampung adalah 2.124 juta/ml. Hal tersebut sesuai dengan Feradis (2010) yang menyatakan bahwa konsentrasi semen segar sapi adalah 1.000 juta sampai 2.000 juta sel spermatozoa per ml.

Persentase hidup spermatozoa pejantan sapi Ongole yang ditampung adalah 86,5%. Hasil tersebut dapat dikatakan baik karena menurut Hafez (2000) persentase hidup spermatozoa harus lebih dari 50%. Persentase abnormalitas spermatozoa yang ditampung adalah 0.7%, hal tersebut sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20%, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi.

Pengaruh Penambahan Rafinosa terhadap Motilitas Spermatozoa

Hasil penelitian persentase motilitas selama proses pembekuan semen meliputi penilaian setelah ekuilibrisasi, *prefreezing*, dan PTM. disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan motilitas spermatozoa sapi Ongole hasil analisis ragam terhadap motilitas

Perlakuan Rafinosa	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrisasi	Setelah <i>Prefreezing</i>	Setelah <i>Thawing motility</i>
	-----%-----		
0,5%	57,50±2,88	36,50±2,50	31,25±2,50
1%	61,25±4,78	37,50±2,88	31,25±2,50
1,5%	62,50±2,88	40,00±4,08	33,75±2,50
2%	62,50±2,88	41,25±2,50	36,25±2,50
2,5%	63,75±2,50	42,50±2,88	36,25±2,75
3%	62,50±2,88	41,25±2,50	35,00±4,00

Hasil analisis ragam spermatozoa setelah ekuilibrisasi tidak berbeda nyata (P>0,05) menunjukkan bahwa dosis rafinosa dalam

pengencer sitrat kuning telur tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa selama ekuilibrisasi. Hal tersebut diduga karena pada saat ekuilibrisasi rafinosa belum termetabolisme dengan sempurna. Rafinosa merupakan trisakarida yang apabila termetabolisme dengan sempurna akan menghasilkan 3 gugus gula yaitu fruktosa, glukosa dan galaktosa sehingga membutuhkan waktu lebih lama untuk menghasilkan energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa. Pada kondisi tersebut rafinosa belum dapat dimanfaatkan secara optimal sebagai energi dan krioprotektan oleh spermatozoa. Akan tetapi, pada fase tersebut perubahan suhu masih dapat dihadapi oleh spermatozoa sehingga efek *cold shock* semakin sedikit.

Hasil rataan persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrisasi (Tabel 2) berada pada kisaran 57--63%. Hasil tersebut masih dapat dikatakan baik dan sesuai dengan pendapat Aminasari (2009) yang menyatakan bahwa motilitas semen yang telah didinginkan pada suhu 5°C tidak boleh berada di bawah 55%, jika dibandingkan dengan semen segar, persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrisasi lebih rendah.

Proses ekuilibrisasi merupakan tahap adaptasi spermatozoa pada kondisi lingkungan yang dingin pada suhu 5°C selama 4 jam. Sugiarti *et al.*, (2004) menyatakan bahwa proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH. Kondisi tersebut menyebabkan perubahan kondisi asam yang bersifat toksik terhadap spermatozoa.

Hasil analisis ragam terhadap motilitas spermatozoa setelah *prefreezing* tidak berbeda nyata ($P>0,05$) menunjukkan bahwa dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur tidak memberikan pengaruh nyata terhadap motilitas spermatozoa selama *prefreezing*. Hal tersebut diduga karena rafinosa tidak dapat digunakan secara sempurna oleh spermatozoa sebagai energi dan krioprotektan. Rafinosa yang tidak dapat berperan sebagai krioprotektan menyebabkan spermatozoa mengalami kerusakan. Ketika membran sperma mengalami kerusakan, enzim aspartat aminotransferase (AspAT) yang merupakan enzim utama dalam mitokondria yang memproduksi ATP akan dilepaskan dari sel dan masuk ke seminal plasma. Kehilangan AspAT akan mengganggu produksi ATP dan mengganggu motilitas spermatozoa (Arifiantini dan Purwantara, 2010).

Hasil rataan persentase motilitas spermatozoa setelah *prefreezing* (Tabel 2) berada pada kisaran 36,50-- 42,50 %. Motilitas spermatozoa setelah *prefreezing* mengalami penurunan yang sangat drastis dibandingkan dengan setelah ekuilibrisasi. Hal ini disebabkan karena adanya perubahan suhu yang sangat rendah yaitu -140°C. Pada perubahan suhu yang ekstrim ini menyebabkan spermatozoa mengalami cekaman dingin (*cold shock*) sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan organel-organel sel spermatozoa. Morel (1999) menyatakan bahwa *cold shock* tersebut akan merubah membran spermatozoa dari konfigurasi normal kekonfigurasi hexagonal yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa.

Hasil analisis ragam terhadap motilitas spermatozoa pada PTM tidak berbeda nyata ($P>0,05$) menunjukkan bahwa penambahan dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur tidak berpengaruh nyata terhadap motilitas spermatozoa diduga karena di dalam pengencer sitrat kuning telur sumber energi yang ditambahkan bukan hanya rafinosa tetapi terdapat fruktosa. Fruktosa merupakan karbohidrat monosakarida yang mudah termetabolisme oleh spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Mukminat (2014) yang menyatakan bahwa fruktosa merupakan monosakarida yang mudah diolah dalam sel spermatozoa menjadi energi. Rafinosa merupakan trisakarida yang apabila termetabolisme akan menghasilkan fruktosa, galaktosa dan glukosa sehingga membutuhkan waktu lebih lama untuk diolah menjadi energi.

Persentase rataan motilitas spermatozoa berada dalam kisaran 31,25-- 36,25%, persentase tersebut sangat rendah dan tidak masuk dalam standar semen beku yaitu 40%. Sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) yang menyatakan bahwa semen yang layak digunakan untuk IB adalah minimal 40% sesuai dengan Standar PTM. Hal tersebut dapat disebabkan karena perubahan ke suhu pembekuan dalam N₂ cair (-196°C) yang menyebabkan spermatozoa mengalami *cold shock* sehingga menyebabkan kerusakan pada membran sel sehingga motilitas spermatozoa terganggu dan menyebabkan kematian sel spermatozoa yang cukup tinggi. Rizal *et al.* (2003) menambahkan bahwa apabila terjadi kerusakan pada membran plasma dapat menyebabkan hilangnya enzim-enzim yang diperlukan dalam proses metabolisme sehingga tidak dihasilkan energi sehingga motilitas menjadi rendah, serta daya hidup juga akan rendah.

Pengaruh Rafinosa terhadap Persentase Spermatozoa Hidup

Hasil penelitian rataan persentase spermatozoa hidup selama proses pembekuan semen meliputi penilaian setelah ekuilibrisasi, *prefreezing*, dan PTM. Data hasil rataan persentase spermatozoa hidup pada penelitian ini disajikan pada Tabel 3.

Table 3. Rataan persentase spermatozoa hidup Sapi Ongole

Perlakuan Rafinosa	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrisasi	Setelah <i>Prefreezing</i>	Setelah <i>Thawing motility</i>
	-----%-----		
0,5%	73,45±4,24	56,46±3,82	32,55±2,38
1%	82,1 ±1,33	57,32±0,44	34,80±1,82
1,5%	83,6 ± 0,80	57,52±12,4	34,85±2,54
2%	84,12±1,20	60,07±3,20	38,50±2,23
2,5%	85,20±1,70	62,80±9,20	38,77±7,21
3%	82,37±1,87	61,70±4,03	37,80±6,21

Hasil analisis ragam persentase spermatozoa hidup menunjukkan dosis rafinosa yang berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase spermatozoa hidup sapi Ongole selama ekuilibrisasi. Penambahan dosis 2,5% pada ekuilibrisasi memberikan pengaruh terhadap persentase spermatozoa hidup sebesar 85,20% dan hasil ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan penambahan dosis rafinosa sebanyak 0,5%, 1%, 1,5 %, 2%, dan 3% dengan persentase spermatozoa hidup 73,45%, 82,10%, 83,65%, 84,12% dan 82,37%.

Uji Polinomial Ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah ekuilibrisasi berpola kuadratik dengan persamaan regresi $\hat{Y} = 66,49 + 17,94x - 4,23x^2$ dan memiliki koefisien korelasi (r) sebesar 76,5% serta koefisien determinan (R^2) sebesar 58,5%. Nilai Y merupakan persentase spermatozoa hidup, sedangkan X adalah dosis rafinosa di dalam pengencer sitrat kuning telur. Nilai r menunjukkan bahwa antara persentase spermatozoa hidup dengan dosis rafinosa memiliki hubungan yang erat sebesar 76,5%, sedangkan nilai R^2 menunjukkan pada dosis rafinosa yang bervariasi memberikan pengaruh sebesar 58,5% terhadap persentase spermatozoa hidup setelah ekuilibrisasi dan sisanya oleh faktor diluar perlakuan.

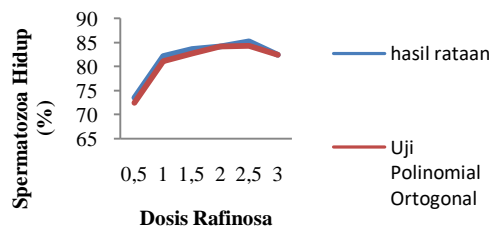
Berdasarkan Uji Polinomial Ortogonal selama ekuilibrisasi dosis rafinosa 2,1% memberikan hasil optimal, hal ini diduga karena dosis rafinosa mampu memberikan perlindungan yang efektif terhadap *cold shock*. Pada proses ekuilibrisasi rafinosa akan

memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Savitri (2014) rafinosa dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin selama penyimpanan pada suhu rendah (5°C). Kejutan dingin tersebut berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma dan perubahan tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma sehingga ion-ion seperti kalsium bebas masuk ke dalam sel. Hubungan dosis rafinosa dengan persentase spermatozoa hidup yang digambarkan pada Gambar 1

$$\hat{Y} = 66,49 + 17,94x - 4,23x^2$$

$$r = 0,765$$

$$R^2 = 0,585$$



Gambar 1. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase spermatozoa hidup Sapi Ongole setelah ekuilibrisasi

Rafinosa merupakan karbohidrat dengan molekul besar. Karbohidrat dengan molekul besar dapat digunakan oleh spermatozoa sebagai krioprotektan ekstraseluler di dalam bahan pengencer. Menurut Supriatna dan Pasaribu (1992), karbohidrat merupakan senyawa yang dapat berperan sebagai krioprotektan ekstraseluler, dan berfungsi melindungi membran plasma sel dari kerusakan. Salmon dan Maxwell (2000) menambahkan bahwa gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (*glass*) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel spermatozoa secara mekanik. Pada dosis rafinosa yang optimal dapat melindungi spermatozoa selama proses ekuilibrisasi sedangkan apabila tidak tepat penggunaannya maka akan menyebabkan efek yang buruk terhadap spermatozoa karena dapat bersifat toksik. Pada dosis 0,5%, 1,5%, dan 2% menunjukkan hasil yang rendah jika dibandingkan dengan dosis 2,5%, hal tersebut disebabkan dosis rafinosa yang tidak optimal di dalam bahan pengencer yang menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa.

Penambahan dosis rafinosa yang semakin tinggi cenderung menyebabkan

meningkatnya tekanan osmotik sehingga menurunkan daya hidup spermatozoa. Pegg (2002) menyatakan bahwa efek dari krioprotektan yang berlebihan akan menyebabkan sel membengkak dan pecah. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh tekanan osmotik larutan pengencer yang terlalu tinggi sehingga air dari dalam sel akan tertarik keluar yang menyebabkan dehidrasi. Menurut Setiono (2015), tekanan osmotik menyebabkan adanya perubahan osmolaritas larutan, sehingga terjadi perpindahan air didalam sel kedalam bahan pengencer karena konsentrasinya yang tinggi. Jika kondisi tersebut berlangsung maka sel akan mengalami dehidrasi dan mengalami kerusakan membran plasma yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa.

Hasil analisis ragam terhadap spermatozoa hidup menunjukkan tidak adanya pengaruh dosis rafinosa terhadap persentase spermatozoa hidup ($P>0,05$) pada saat *prefreezing*. Persentase spermatozoa hidup berada pada kisaran 56,46--62,50%, Persentase tersebut masih dalam kisaran normal. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) yang menyatakan bahwa standar persentase sel hidup sperma beku yang baik yaitu $>50\%$. Proses *prefreezing* menyebabkan penurunan persentase spermatozoa hidup. Hal tersebut dapat disebabkan karena perubahan suhu yang drastis, dari suhu 5°C menjadi -140°C . Perubahan suhu drastis akan menyebabkan kerusakan spermatozoa yang disebabkan karena *cold shock*. Kerusakan spermatozoa akan menyebabkan kematian pada spermatozoa. Menurut White (1993), pengaruh *cold shock* berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma sel, yakni perubahan bentuk dari cair ke gel yang terjadi pada suhu di bawah 20°C . Perubahan tatanan rantai asam lemak dan protein pada membran plasma menyebabkan kebocoran atau selektivitas membran plasma rusak.

Penambahan dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur yang tidak berpengaruh nyata diduga disebabkan karena rafinosa merupakan karbohidrat dengan molekul besar yang apabila termetabolisme dengan sempurna akan menghasilkan energi yang lebih banyak. Tingginya energi yang dihasilkan akan menyebabkan tingginya asam laktat yang menyebabkan suasana tidak nyaman bagi spermatozoa dan dapat bersifat toksik. Mukminat (2014) menyatakan bahwa penambahan sukrosa 2% menghasilkan energi dua kali lebih besar dari glukosa dan fruktosa,

pemberian sukrosa juga tidak berpengaruh nyata dalam mempertahankan hidup spermatozoa, hal ini disebabkan karena dalam menghasilkan energi sukrosa akan menghasilkan asam laktat yang lebih banyak sehingga bersifat toksik bagi spermatozoa.

Hasil analisis ragam pada PTM menunjukkan dosis rafinosa yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap persentase spermatozoa hidup. Persentase spermatozoa hidup setelah PTM berada pada kisaran 32,55--38,77%. Persentase tersebut mengalami penurunan dibandingkan dengan setelah *prefreezing*. Penurunan tersebut diduga karena perubahan ke suhu pembeku dalam N^2 cair (-196°C) sampai ke suhu setelah *thawing* 37°C menyebabkan stres osmotik. Pegg (2002) menyatakan stres osmotik pada saat *thawing* disebabkan oleh efek dari krioprotektan yang berlebihan, sehingga menyebabkan sel membengkak dan pecah. Best (2011) menambahkan bahwa hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh tekanan osmotik larutan pengencer yang terlalu tinggi sehingga air dari dalam sel akan tertarik keluar yang menyebabkan dehidrasi.

Rafinosa yang berfungsi sebagai krioprotektan diduga menyebabkan tingginya osmolaritas didalam laurat sehingga menyebabkan stres osmotik pada spermatozoa. Siswanto (2006) dalam Setiono (2015) menyatakan bahwa tekanan osmotik harus dipertahankan selama proses pembekuan semen karena bila tidak dipertahankan akan mengakibatkan tekanan osmotik didalam dan diluar sel berbeda sehingga air akan mengalir ke daerah yang bertekanan osmotik tinggi.

Pengaruh Rafinosa terhadap Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Hasil penelitian rataan persentase spermatozoa abnormal selama proses pembekuan semen meliputi penilaian setelah ekuilibrisasi, *prefreezing*, dan PTM. Data hasil rataan persentase abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini disajikan pada Tabel 4.

Hasil analisis ragam terhadap abnormalitas spermatozoa menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$) pada setiap pembekuan. Persentase abnormalitas spermatozoa pada setiap pembekuan berada pada kisaran 0,77--3,75%. Persentase abnormalitas tersebut masih dikatakan baik karena sesuai dengan pendapat Bretzlaff (1995) yang menyatakan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa semen segar yang baik untuk inseminasi buatan tidak lebih dari 20%.

Abnormalitas spermatozoa dapat disebabkan oleh pengaruh penurunan pH semen, tekanan osmotik dan stres dingin yang terjadi selama penyimpanan. Sesuai dengan pendapat Solihati (2008) yang menyatakan bahwa abnormalitas disebabkan karena kejutan suhu dingin dan ketidak seimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolisme yang terus berlangsung selama penyimpanan pada suhu 5°C. Ditambahkan oleh Salisbury et al., (1985) bahwa *cold shock* dan perubahan tekanan osmotik terhadap spermatozoa yang diejakulasikan menyebabkan perubahan pembentukan spermatozoa yang dapat menyebabkan abnormalitas.

Tabel 4. Rataan persentase Abnormalitas spermatozoa Sapi Ongole

Perlakuan Rafinosa	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrasi	Setelah Prefreezing	Setelah Thawing motility
	-----%-----		
0,5%	2,77±1,50	0,77±0,55	3,75±3,33
1%	1,7 ±1,75	1,42±0,53	1,32±1,19
1,5%	1,90±1,92	2,07±0,78	1,65±1,35
2%	2,70±1,59	1,77±1,70	1,55±1,09
2,5%	3,45±1,31	2,60±2,98	2,35±0,85
3%	3,17±1,47	1,52±1,02	1,77±0,96

Hasil analisis ragam terhadap abnormalitas spermatozoa pada setiap pembekuan menunjukkan hasil tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Kondisi tersebut menunjukkan bahwa dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur tidak memberikan pengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa. Hal tersebut diduga karena kerusakan membran plasma yang terjadi akibat *cold shock* dan perubahan tekanan osmotik tidak menyebabkan perubahan yang signifikan terhadap bentuk fisik spermatozoa. Krystalia (2013) menyatakan bahwa rafinosa adalah suatu trisakarida yang penting, terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan, yaitu fruktosa-glukosa-galaktosa. Setelah dihidrolisis sempurna, gugus gula yang pertama digunakan oleh spermatozoa adalah fruktosa. Fruktosa dalam sel difosforilasi oleh heksokinase atau fruktokinase yang akhirnya menjadi fruktosa 1 fosfat. Lalu akan dipecah menjadi DHAP (dihidroksiasetonfosfat) dan Gliseraldehid oleh aldolase B. DHAP dapat secara langsung masuk ke glikolisis dan glukoneogenesis di dalam sel. Pembentukan sorbitol berubah menjadi fruktosa di dalam sel sperma oleh enzim sorbitol dehidrogenase dan inilah

sumber energi sperma. Sorbitol tidak seperti glukosa, sorbitol tidak bisa melewati membran sel akibatnya sorbitol terjebak didalam sel. Ketika sorbitol dehidrogenasenya rendah sorbitol akan menumpuk didalam sel. Ini menyebabkan efek osmotik meningkat, sorbitol menarik air sehingga terjadi pembengkakan dan menyebabkan kematian spermatozoa. Pembengkakan membran plasma hanya menyebabkan kematian pada spermatozoa tetapi sebagian besar spermatozoa yang mati masih memiliki bentuk yang normal.

SIMPULAN

1. Penambahan dosis rafinosa di dalam pengencer sitrat kuning telur berpengaruh terhadap persentase spermatozoa hidup pada ekuilibrasi berpola kuadratik dengan persamaan $\hat{Y} = 66,49 + 17,94x - 4,23x^2$.
2. Penambahan dosis rafinosa yang optimum terhadap persentase spermatozoa hidup yaitu 2,1%

DAFTAR PUSTAKA

- Affandhy, L., Dikman dan Aryogi. 2007. Petunjuk Teknis Manajemen Perkawinan Sapi Potong. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Loka Penelitian Sapi Potong. Grati, Pasuruan
- Aminasari, D.P. 2009. Pengaruh Umur Pejantan Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. <http://elibrary. Ub. Ac. Id/bitstream/123456789/21674/1/pengaruh-umur-pejantan-terhadap-kualitas-semen-beku-sapi-limousin.pdf>. Diakses 3 Juni 2016
- Arifiantini RI dan Purwantara B. 2010. Motility and viability of Fresian Holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. J Indonesian Trop Anim Agric 35(4) : 222-226.
- Best, B. 2011. Viability, Cryoprotectant Toxicity and Chilling Injury in Cryogenics. <http://www.benbest.com/pdf>. Diakses pada 4 Juni 2016
- Brezlaff, K. 1995. Goat Breeding and Infertility.p. 169-207. in. J. Meredith (eds). Animal Breeding and Infertility. Blackweel Science Ltd. Victoria, Australia
- Burhan, B., 2003. Panduan Praktis Memilih Produk Daging Sapi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta

- Butar, E. 2009. Efektifitas Frekuensi Exersice Terhadap Peningkatan Kualitas Semen Sapi Simental. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/1/09/E00898.pdf>. Diakses pada 3 Juni 2011
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung
- Hafez, E. S. E. 2000. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animals. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA
- Krystalia, C. 2013. Metabolisme Fruktosa dan Galaktosa. <http://cindy-krystalia.co.id/2013/05/biokimia.html>. Diakses pada 7 Juni 2016
- Lindsay, D.R., K.W. Entwistle dan A. Winantea. 1982. Reproduksi Ternak di Indonesia. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang
- Morel DMCG. 1999. Equine Artificial Insemination. Wallingford. Cabi Publishing
- Mukminat, A. 2014. Pengaruh Penambahan Berbagai Sumber Karbohidrat pada Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Nalbandov AV. 1990. Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Cetakan Pertama. Jakarta: Universitas Indonesia. UI-Press
- Pegg DE. 2002. The history and principles of cryopreservation. Seminar Reprod Med. 20:5-13
- Rizal, M.R., Toeliher, T.L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2003. Kriopreservasi semen domba Garut dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. Media Kedokteran Hewan. 19(2): 79-83
- Salisbury, G.W. dan N.L. Van Denmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Salmon, S. And W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim, reprod. Sci.62:77-111
- Savitri, O.A., T.Y. Laswardi, D. Sajuthi dan R.A. Iis. 2014. Kualitas semen cair kambing peranakan Etawah dalam modifikasi pengencer Tris dengan Trehalosa dan Rafinosa. Jurnal Veteriner. 15 (1):11- 22
- Setiono, N. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman dengan Dosis Krioprotektan Gliserol yang Berbeda dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Sinha, S., B.C. Deka, M.K. Tamulu, dan B.N. Borgohain. 1992. Effect of equilibration period and glicerol level in tris extender of quality of frozen goat semen. Indian Vet. J. Vol 69: 1107--1110
- Solihati, N., R. Idi, S. R. Darojah, M. Rizal, dan M. Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi Peranakan Ongole (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5⁰C. Animal Production. 1 (10) : 22-29
- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie., 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika (Pendekatan Biometrik) Penerjemah B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Sugiarti, T., E. Triwlaningsih, P. Situmorang, R.G. Sianturi dan D.A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan katalase dalam produksi semen dingin sapi. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4 – 5 Agustus 2004. Puslitbang Peternakan. Bogor. hlm. 215 – 220
- Supriatna, I dan F.H. Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Toelihere. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung
- _____ 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa. Bandung
- White, I. G. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. Reprod. Fertil. Dev. 5: 639-658