

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

*The Effect of Addition Rafinosa Doses in Tris Yolk Diluent for Motility, Percentage of Live and  
Abnormalities Spermatozoa Ongole Cattle*

**Iis Nurlia<sup>a</sup>, Sri Suharyati<sup>b</sup>, Madi Hartono<sup>b</sup>**

<sup>a</sup>The Student of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

<sup>b</sup> 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 Gedung Meneng Bandar Lampung 35145

e-mail : [jipt\\_universitaslampung@yahoo.com](mailto:jipt_universitaslampung@yahoo.com)

**ABSTRACT**

*The research was conducted on May 16—18 at the Laboratory of Technical Services Unit Regional Artificial Insemination Central Lampung, using semen from Ongole cattle. aims of this research were determine the effect of different doses of rafinose and determine the optimal doses rafinosa in tris yolk diluent for motility, percentage of live and abnormalities spermatozoa Ongole cattle. The experimental design used completely randomized design with 6 treatments rafinosa doses (0,5%; 1,0%, 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3%) in tris yolk diluent with 4 times replications. The data were analyzed using analysis of varian with 5% or 1% significance level. Significantly different results was further tested by orthogonal polynomials. The results showed that the addition of rafinosa doses effect were not significantly different ( $p > 0.05$ ) on percentage motility after prefreezing and Post Thawing Motility, the percentage of live sperm Post Thawing Motility, and the percentage of abnormal spermatozoa after equilibration, prefreezing, and Post Thawing Motility, but the effect is very significantly ( $p < 0.01$ ) on percentage motility spermatozoa after equilibration and percentage of live spermatozoa after prefreezing. Addition doses of rafinose significant effect ( $p < 0.05$ ) on the percentage of live sperm after equilibration. Addition doses rafinose based patten ortogonal polinomial regression on percentege motility after equilibration with equations  $\bar{y} = 65,58 - 2,36x$ , the percentage of live sperm after equilibration with aquations  $\bar{y} = 81,23 - 4,47x$ , and the percentage of live sperm after prefreezing with aquations  $\bar{y} = 79,13 - 4,68x$ .*

*Keywords : Rafinosa , Egg Yolk Tris, Motility, Percentage of Live, Abnormalities, Ongole Cattle*

**PENDAHULUAN**

Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu upaya pemanfaatan bibit pejantan unggul dalam rangka perbaikan mutu genetik ternak. Dengan pemanfaatan teknologi IB perkembangan dan peningkatan populasi ternak terutama sapi dapat lebih cepat karena dengan teknologi IB ini pemanfaatan bibit pejantan unggul akan lebih efisien. Salah satu pejantan yang baik untuk dikembangkan adalah sapi Ongole.

Sapi Ongole adalah sapi yang berasal dari India dan merupakan ternak tertua di dunia yang dijinakkan di India. Karakteristik sapi Ongole adalah berbadan besar, berpunuk besar, bergelambir longgar, dan berleher pendek. Kepala, leher, gelambir, dan lutut berwarna hitam, terutama sapi jantan.

Salah satu bahan pengencer semen sapi adalah tris kuning telur yang memiliki keunggulan spermatozoa lebih cepat menyesuaikan diri dengan larutan pengencer ini, dapat mencegah perubahan pH, pada pengamatan menggunakan mikroskop terlihat bersih dan jernih tanpa butiran lemak.

Penambahan karbohidrat ke dalam pengencer akan sangat berguna dan membantu bagi daya hidup spermatozoa (Salisbury dan VanDemark, 1985). Beberapa jenis karbohidrat yang dapat digunakan dalam pengenceran semen seperti glukosa, fruktosa, sukrosa, laktosa, dan rafinosa.

Rafinosa merupakan suatu trisakarida terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan yaitu galaktosa-glukosa-fruktosa. Sampai saat ini informasi tentang penggunaan rafinosa dalam pengencer tris kuning telur

masih sangat sedikit. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap penambahan dosis rafinosa yang optimal pada pengencer tris kuning telur pada semen beku sapi Ongole.

## MATERI DAN METODE

### Materi

Peralatan yang digunakan adalah vagina buatan, tabung penampung berskala dengan ketelitian 0,1 ml, labu didih dan penangas, timbangan digital dengan merk Cook master electronic kitchen scale No: GP KS043 dengan ketelitian 0,01 g, termometer, spatula, corong, gelas ukur pyrex, kertas label, kertas *whatman*, *waterbath*, *object* dan *cover glass*, spektrofotometer minutube, micropipet dengan ketelitian 0,1 ml, *beaker glass*, tabung erlenmeyer, *cooltop*, mesin *filling and sealing*, pH meter, boks untuk *prefreezing* dan *freezing*, mikroskop, tisu, *counter number*, *stopwatch*, dan kontainer, serta alat tulis.

Bahan yang digunakan adalah semen segar sapi Ongole, zat pewarna (eosin 2%), NaCl fisiologi, NaCl 3%, air hangat untuk proses *thawing*, bahan pengencer yang terdiri dari tris aminomethan, kuning telur, fruktosa, rafinosa, asam sitrat, antibiotik (penisilin dan streptomisin), gliserol, aquabidest, dan nitrogen cair.

### Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 kali perlakuan dengan 4 kali pengulangan. Perlakuan yang dicobakan adalah konsentrasi rafinosa sebagai berikut

- R1 : penambahan rafinosa 0,5% dalam bahan pengencer.
- R2 : penambahan rafinosa 1,0 % dalam bahan pengencer.
- R3 : penambahan rafinosa 1,5% dalam bahan pengencer.
- R4 : penambahan rafinosa 2,0% dalam bahan pengencer.
- R5 : penambahan rafinosa 2,5% dalam bahan pengencer.
- R6 : penambahan rafinosa 3,0% dalam bahan pengencer.

### Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dimulai dengan penampungan semen menggunakan vagina buatan dan segera diperiksa secara makroskopis (warna, bau, volume, pH, dan konsistensi semen segar) dan mikroskopis (motilitas massa, motilitas individu,

konsentrasi, persentase spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa). Semen segar yang memenuhi syarat akan diproses lebih lanjut ke proses pengenceran.

Pembuatan pengencer tris kuning telur yaitu pembuatan *buffer* tris, penambahan kuning telur, penambahan gliserol dan antibiotik. Pembuatan *buffer* tris dan penambahan kuning telur dilakukan sehari sebelum penampungan semen, hal ini dilakukan untuk memisahkan endapan dengan supernatan dan yang digunakan hanya supernatannya, supernatan yang digunakan sebanyak 94% kemudian ditambahkan gliserol 6% dan antibiotik, selanjutnya dibagi menjadi 6 dengan masing-masing 10 ml lalu tiap bagian ditambahkan dosis rafinosa yang berbeda yaitu 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% dan 3,0%.

Semen yang telah diencerkan kemudian di ekuilibrasikan selama 4 jam pada suhu 5—6°C. Setelah ekuilibrasikan, dilakukan pemeriksaan motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa. Semen dikemas melalui proses *filling and sealing*. Pembekuan semen diawali dengan proses *prefreezing* pada suhu -140°C, kemudian dilakukan evaluasi setelah *prefreezing*. Proses selanjutnya adalah *freezing* dalam nitrogen cair selama 1 hari yang kemudian dilakukan evaluasi *Post Thawing Motility* yang meliputi motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa.

### Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah

1. Motilitas spermatozoa  
Standar penilaian gerakan individu yang terlihat di bawah mikroskop adalah 0—100%.
2. Persentase spermatozoa hidup  
dihitung dengan rumus:

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

(Mumu, 2009).

3. Abnormalitas spermatozoa  
dihitung dengan rumus:

$$\text{abnormalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah sel spermatozoa keseluruhan}} \times 100\%$$

(Salmah, 2014).

### Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1% dan untuk

pengaruh yang nyata dilanjutkan dengan uji Polinomial Ortogonal (Steel dan Torrie, 1993).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Evaluasi Kualitas Semen Segar Sapi Ongole**

Hasil evaluasi semen segar disajikan pada Tabel 1. Sapi Ongole dengan kode pejantan 21002 yang digunakan telah berumur 6 tahun, sesuai dengan pendapat Susilawati *et al* (2003) yang menyatakan bahwa pejantan berumur 2 sampai 7 tahun dapat menghasilkan semen terbaik dengan angka kebuntingan yang tinggi pada betina yang dikawini dibandingkan dengan pejantan umur diluar interval tersebut. Pakan yang diberikan kepada pejantan yang digunakan berupa hijauan dan konsentrat. Hijauan yang diberikan berupa rumput gajah dan konsentrat yang diberikan berupa konsentrat sapi. Fathul *et al*, (2013) menyatakan bahwa rumput gajah memiliki kandungan protein 8,69% dan menurut Standar Operasional Prosedur Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung Tengah (2010), kebutuhan protein dari sapi pejantan adalah 14—17%, hal ini telah tercukupi dengan pakan yang berikan berupa hijauan dan penambahan konsentrat sapi yang memiliki kandungan protein 16—18%.

Hasil evaluasi semen segar yang dihasilkan menunjukkan bahwa semen berwarna putih susu. Kondisi ini masih dalam kisaran normal dan sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) yang menyatakan bahwa semen sapi normal berwarna seperti susu atau krem keputih-putihan dan keruh. Bau pada semen yang tertampung adalah bau khas yang menunjukkan bahwa semen yang tertampung tersebut normal sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa sapi pejantan menghasilkan semen yang berbau khas.

Tabel 1. Hasil evaluasi semen segar sapi Ongole

Evaluasi	Nilai
Warna	Putih Susu
Bau	Khas
Volume	6,5 ml
Konsistensi	Kental
Ph	6
Konsentrasi	1851
Motilitas massa	+++
Motilitas individu (%)	75
Spermatozoa hidup (%)	89,5
Abnormalitas (%)	2,5

Pemeriksaan volume semen dilakukan secara langsung setelah penampungan yaitu sebesar 6,5 ml. Menurut Aereus *et al* (2004),

volume semen bervariasi antara 1—12 ml tiap ejakulasi untuk sapi yang masih muda dan untuk sapi yang telah dewasa dapat menghasilkan semen tiap ejakulat 10—15 ml. Toelihere (1993) menyatakan bahwa volume semen sapi jantan berkisar 1—15 ml. Berdasarkan hal tersebut volume semen sapi yang dihasilkan dalam kisaran normal dengan kondisi yang baik.

Derajat keasaman (pH) semen diukur dengan pH meter. Berdasarkan hasil yang didapat semen segar sapi Ongole memiliki pH 6 hal tersebut masih dalam kisaran normal. Hal ini sesuai pendapat Salisbury dan VanDemark (1985), bahwa pH semen yang normal berkisar 6,2—7,5, sedangkan kisaran pH semen sapi pejantan menurut Garner dan Hafez (2000) sebesar 6,4—7,8. Konsentrasi spermatozoa semen segar yang didapat adalah 1851 juta/ml. Hal ini sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000), konsentrasi spermatozoa berkisar antara 800—2.000 juta sel/ml. Toelihere (1993) menyatakan bahwa semen sapi dengan konsistensi krem mempunyai konsentrasi 1.000—2.000 juta sel/ml. Hal ini berarti konsentrasi semen dalam kisaran normal.

Hasil evaluasi gerakan massa yang didapat adalah (+++). Kondisi tersebut dalam keadaan baik karena menurut Toeliehere (1981), penilaian gerakan massa (+++) menunjukkan bahwa spermatozoa dalam keadaan baik karena terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, tebal, dan aktif berpindah tempat.

Motilitas spermatozoa menjadi faktor penentu utama untuk layak atau tidaknya semen tersebut dilanjutkan proses berikutnya. Berdasarkan hasil evaluasi semen segar didapat motilitas semen sebesar 75%. Hal ini sesuai dengan pendapat Rizal dan Hardis (2008) yang menyatakan bahwa semen segar yang baik dan memenuhi syarat untuk diproses menjadi semen beku harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 65—70% .

Jumlah persentase spermatozoa hidup yang didapat adalah 89,5%. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa semen segar dalam kondisi baik. Hal ini sesuai pendapat Hafez (2000) yang menyatakan bahwa persentase hidup semen sapi segar sebesar 60—80%. Toelihere (1993) menyatakan bahwa semen yang baik memiliki persentase viabilitas diatas 50%.

Abnormalitas semen segar didapat sebesar 2,5%. Selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi (Toelihere, 1993).

Hal ini menunjukkan bahwa semen segar yang didapat dalam kondisi baik.

**Pengaruh Penambahan Berbagai Dosis Rafinosa terhadap Kualitas Spermatozoa**

**1. Penilaian motilitas spermatozoa selama pembekuan**

Motilitas spermatozoa adalah spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan), tidak termasuk spermatozoa yang hanya bergerak di tempat, berputar-putar, dan maju mundur. Susilawati (2003) menyatakan bahwa motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa mempunyai peranan penting dalam proses fertilisasi. Hasil penelitian yang menunjukkan persentase motilitas spermatozoa disajikan pada Tabel 2.

Hasil rata-rata motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi berkisar 58—65%. Hal ini masih dalam kondisi yang baik. Aminasari (2009) menyatakan bahwa motilitas semen yang telah didinginkan pada suhu 5°C tidak boleh berada di bawah 55%.

Tabel 2. Hasil rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Ongole

Rafinosa	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrasi	Setelah Prefreezing	Post Thawing Motility
	-----%-----		
0,5 %	65,00±0,00	46,25±4,79	43,75±2,50
1,0%	62,50±2,89	46,25±4,79	41,25±2,50
1,5 %	62,50±2,89	46,25±4,79	40,00±5,77
2,0%	60,00±0,00	43,75±4,79	38,75±6,29
2,5 %	60,00±0,00	43,75±2,50	38,75±4,79
3,0%	58,75±2,50	43,75±4,79	37,50±5,00

Persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi lebih rendah jika dibandingkan semen segar, penurunan persentase ini diduga disebabkan oleh penumpukan asam laktat yang tinggi sebagai hasil akhir metabolisme sel (Sinha et al, 1992). Proses ekuilibrasi merupakan proses adaptasi spermatozoa dengan perubahan kondisi lingkungan yang dingin selama 4 jam pada suhu 5°C. 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 akibat penurunan pH.

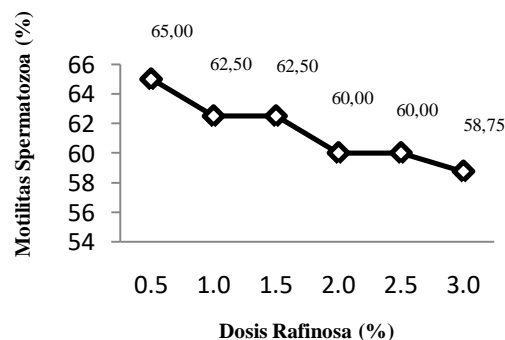
Hasil analisis ragam terhadap motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata (P<0,01). Uji polinomial ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap motilitas

spermatozoa berpola linier dengan persamaan regresi  $\hat{y} = 65,58 - 2,36x$  dan memiliki koefisien korelasi (r) sebesar 75% serta koefisien determinasi (R<sup>2</sup>) sebesar 56%. Hubungan antara dosis rafinosa dengan motilitas spermatozoa disajikan pada Gambar 1.

Nilai koefisien determinasi (R<sup>2</sup> = 0,56) menunjukkan bahwa 56% motilitas spermatozoa sapi Ongole dipengaruhi oleh dosis rafinosa 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% dan 3,0% sisanya 44% dipengaruhi oleh faktor lain diluar perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan dosis rafinosa berpengaruh dalam mempertahankan motilitas spermatozoa hingga suhu 5°C baik sebagai sumber energi maupun sebagai krioprotektan ekstraseluler. Kayser et al, (1992) menyatakan bahwa untuk meminimalkan kerusakan sel akibat pengaruh buruk suhu rendah, maka upaya yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan zat tertentu ke dalam pengencer semen, pernyataan tersebut diperjelas oleh Supriyatna dan Pasaribu (1992) yang mengatakan bahwa zat tersebut dikenal dengan nama krioprotektan seperti beberapa jenis gula (krioprotektan ekstraseluler) yang dapat digunakan dalam proses kriopreservasi dan preservasi semen pada suhu 3—5°C. Di samping berperan sebagai senyawa krioprotektan, gula juga dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai substrat sumber energi. Faktor lain yang mempengaruhi motilitas spermatozoa seperti pakan, umur ternak, dan frekuensi penampungan.

$$\hat{y} = 65,58 - 2,36x$$

$$R^2 = 0,56 ; r = 0,75$$



Gambar 1. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi

Penambahan dosis rafinosa 0,5% memberikan persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi tertinggi yaitu 65,00% dan dosis rafinosa 3,0% memberikan hasil terendah sebesar 58,75% dibandingkan dosis yang lain. Semakin tinggi dosis yang diberikan akan menyebabkan persentase motilitas setelah

ekuilibrase semakin menurun, hal ini diduga karena penambahan rafinosa 3,0% akan menyebabkan peningkatan tekanan osmotik enam kali lipat lebih tinggi dibandingkan penambahan rafinosa 0,5%. Peningkatan tekanan osmotik di dalam sel akan menyebabkan kerusakan membran plasma. Siswanto dalam Setiono (2015) menyatakan bahwa tekanan osmotik harus dipertahankan selama proses pembekuan semen karena bila tidak dipertahankan akan mengakibatkan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel berbeda sehingga air akan mengalir ke daerah yang bertekanan tinggi.

Rafinosa sebagai substrat sumber energi, akan dihidrolisis sempurna menjadi fruktosa, glukosa, dan galaktosa akan masuk ke dalam sel dengan dua mekanisme, yaitu transpor aktif dan difusi (Mansjur, 2001). Molekul — molekul karbohidrat ini akan dimetabolisir melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam trikarboksilat (siklus Krebs), sehingga dihasilkan energi berupa ATP yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam pergerakan (Rizal dan Herdis, 2008). Proses glikolisis akan dihasilkan 2 mol asam piruvat dan 2 ATP. Asam piruvat yang dihasilkan akan diolah lebih lanjut di dalam siklus Krebs untuk menghasilkan energi, satu mol asam piruvat akan menghasilkan 18 ATP, sehingga 2 mol asam piruvat yang masuk dalam siklus Krebs akan menghasilkan 36 ATP. Total molekul karbohidrat yang telah dimetabolisme melalui proses glikolisis dan siklus Krebs adalah 38 ATP (Poedjadi, 1994). Satu gugus gula menghasilkan 38 ATP, rafinosa yang merupakan trisakarida akan menghasilkan 114 ATP. Dengan total energi yang dihasilkan berbeda maka terdapat perbedaan metabolisme antara dosis rafinosa 0,5% dan 3,0%

Tingkat metabolisme spermatozoa pada dosis rafinosa 3,0% diduga enam kali lebih tinggi yaitu 342 ATP dibandingkan dosis rafinosa 0,5% sebesar 57 ATP sehingga penumpukan asam laktat yang merupakan hasil akhir metabolisme meningkat yang menyebabkan suasana tidak nyaman bagi spermatozoa. Sugiarti et al, (2004) menyatakan bahwa proses pendinginan pada suhu 5oC akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam akibat penurunan pH. Kondisi tersebut tentunya akan berdampak pada penurunan motilitas spermatozoa.

Hasil analisis ragam terhadap motilitas spermatozoa setelah *prefreezing* dan *post thawing motility* menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Kondisi tersebut menunjukkan bahwa penambahan dosis rafinosa di dalam pengencer tris kuning telur tidak memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa selama proses *prefreezing* dan *freezing*. Hal ini diduga karena penggunaan rafinosa hingga level 3,0% tidak mampu berperan sebagai sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler selama proses *prefreezing* dan *freezing* sehingga kerusakan dan kematian spermatozoa akibat *cold shock* tidak dapat dihindari.

## 2. Penilaian persentase spermatozoa hidup selama pembekuan

Penilaian spermatozoa hidup dilakukan dengan pengecatan atau pewarnaan dengan menggunakan eosin. Tujuan pewarnaan adalah untuk mengetahui persentase sel-sel sperma yang mati dan yang hidup (Hafez, 1987). Rataan persentase spermatozoa hidup hasil penelitian selama proses pembekuan yang meliputi ekuilibrase, *prefreezing*, dan *post thawing motility* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil rata-rata persentase spermatozoa hidup sapi Ongole

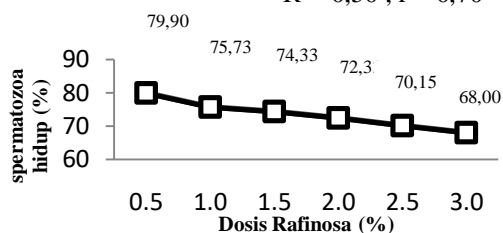
Rafinosa	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrase	Setelah <i>Prefreezing</i>	<i>post thawing motility</i>
	-----%-----		
0,5%	79,90 ± 4,04	75,35 ± 3,65	53,15 ± 8,36
1,0%	75,73 ± 2,32	73,55 ± 4,93	53,15 ± 8,36
1,5%	74,33 ± 7,38	73,03 ± 2,74	49,95 ± 3,98
2,0%	72,33 ± 5,48	72,63 ± 3,93	47,80 ± 4,52
2,5%	70,15 ± 2,90	69,70 ± 6,45	46,90 ± 6,50
3,0%	68,00 ± 1,24	61,35 ± 0,35	44,35 ± 5,45

Hasil analisis ragam persentase spermatozoa hidup menunjukkan berbeda nyata ( $P<0,05$ ) pada saat ekuilibrase. Berdasarkan rata-rata persentase spermatozoa hidup berada pada kisaran 68—79%. Uji polinomial ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah ekuilibrase memiliki persamaan  $\hat{y} = 81,23 - 4,47x$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 70% serta koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 50%. Nilai  $Y$  adalah persentase spermatozoa hidup dan  $X$  adalah dosis rafinosa memiliki hubungan sebesar 70%, sedangkan nilai  $R^2$  menunjukkan pada dosis rafinosa yang berbeda memberikan pengaruh sebesar 50% terhadap spermatozoa hidup setelah ekuilibrase dan sisanya oleh faktor lain diluar perlakuan. Grafik yang menunjukkan adanya hubungan antara dosis

rafinosa dan persentase hidup spermatozoa setelah ekuilibrasi disajikan pada Gambar 2 dalam grafik persamaan berpola regresi linier.

$$\bar{y}=81,23-4,47x$$

$$R^2= 0,50 ; r = 0,70$$



Gambar 2. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase spermatozoa hidup sapi Ongole setelah ekuilibrasi

Penambahan dosis rafinosa sampai 3,0% mampu mempertahankan persentase spermatozoa hidup selama ekuilibrasi, hal ini diduga karena dosis rafinosa mampu memberikan sumber energi dalam proses penurunan suhu hingga 5°C selama 4 jam bagi spermatozoa untuk metabolisme. Hal ini sesuai pendapat Aini (2014) yang menyatakan bahwa tingginya persentase spermatozoa hidup disebabkan oleh masih adanya sumber energi yang dibutuhkan spermatozoa sehingga dapat menjaga ketahanan hidup spermatozoa.

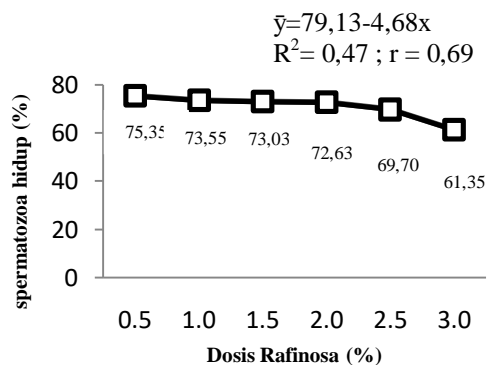
Berdasarkan hasil rataan, semakin tinggi dosis rafinosa yang ditambahkan maka persentase spermatozoa hidup setelah ekuilibrasi semakin menurun, hal ini diduga akibat dari tekanan osmotik yang semakin meningkat sejalan dengan meningkatnya dosis rafinosa sampai 3%. Peningkatan tekanan osmotik di dalam sel akan menyebabkan kerusakan membran plasma. Siswanto dalam Setiono (2015) menyatakan bahwa tekanan osmotik harus dipertahankan selama proses pembekuan semen karena bila tidak dipertahankan akan mengakibatkan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel berbeda sehingga air akan mengalir ke daerah yang bertekanan tinggi. Jika proses tersebut terjadi sel akan mengalami dehidrasi dan menyebabkan kematian sel karena air di dalam sel akan keluar. Sehingga akan menyebabkan daya hidup spermatozoa semakin menurun.

Hasil analisis ragam penambahan dosis rafinosa memberikan pengaruh yang sangat nyata ( $P<0,01$ ) terhadap persentase spermatozoa hidup setelah preefreezing. Rataan persentase spermatozoa hidup setelah preefreezing berada pada kisaran 61—75%. Penambahan dosis rafinosa 0,5% memberikan hasil tertinggi yaitu 75,35% dibandingkan dosis rafinosa 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% dan 3,0%

dengan persentase hidup 73,55%; 73,03%; 72,63%; 69,70% dan 61,35%. Uji polinomial ortogonal menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap spermatozoa hidup setelah preefreezing memiliki persamaan  $\bar{y}=79,13-4,68x$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 69% serta koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 47%. Hubungan antara dosis rafinosa dengan spermatozoa hidup setelah preefreezing digambarkan (Gambar 3) pada grafik regresi linier.

Nilai Y adalah persentase spermatozoa hidup dan X adalah dosis rafinosa memiliki hubungan sebesar 69% sedangkan nilai  $R^2$  menunjukkan pada dosis rafinosa yang berbeda memberikan pengaruh sebesar 47% terhadap spermatozoa hidup setelah ekuilibrasi dan sisanya oleh faktor lain diluar perlakuan.

Berdasarkan hasil uji lanjut polinomial ortogonal dilihat dari koefisien korelasi dan koefisien determinasi penambahan dosis rafinosa berpengaruh terhadap spermatozoa hidup setelah preefreezing. Hal ini diduga dosis rafinosa yang ditambahkan dalam pengencer tris kuning telur sampai 3,0% dapat digunakan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler sehingga dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin selama preefreezing. Menurut Rizal et al, (2006) menunjukkan bahwa adanya perbaikan kualitas semen beku dengan penambahan berbagai jenis gula seperti rafinosa di dalam pengencer menjadi indikator bahwa gula-gula tersebut efektif melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses kriopreservasi semen.



Gambar 3. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase spermatozoa hidup sapi Ongole setelah preefreezing

Gula sebagai krioprotektan ekstraseluler akan melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan secara mekanik yang terjadi saat proses kriopreservasi semen. Menurut Salmon dan Maxwell (2000), gula

dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (*glass*) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel spermatozoa secara mekanik. Gula dapat melindungi membran plasma sel spermatozoa karena pada bagian luar membran plasma sel terdapat karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid) atau protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks (Subowo, 1995).

Semakin tinggi penambahan dosis rafinosa dalam pengencer tris kuning telur semakin rendah persentase spermatozoa hidup setelah *prefreezing* yang dihasilkan, hal ini diduga terdapat perbedaan tekanan osmotik larutan di dalam pengencer sehingga terjadi peningkatan tekanan osmotik di dalam sel yang menyebabkan kerusakan membran plasma sel. Menurut Siswanto dalam Setiono (2015), tekanan osmotik harus dipertahankan selama proses pembekuan semen karena bila tidak dipertahankan akan mengakibatkan tekanan osmotik di dalam dan di luar sel berbeda sehingga air akan mengalir ke daerah yang bertekanan osmotik tinggi. Apabila proses tersebut terjadi sel akan mengalami dehidrasi dan menyebabkan kematian sel karena air di dalam sel akan keluar sebagai dampak perubahan osmolaritas larutan.

Hasil analisis ragam penambahan dosis rafinosa terhadap persentase spermatozoa hidup *post thawing motility* menunjukkan pengaruh tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Persentase rataan spermatozoa hidup *post thawing motility* berada dalam kisaran 44—53%, persentase spermatozoa hidup ini masih dalam kisaran normal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Samsudewa (2008) bahwa persentase spermatozoa hidup setelah dibekukan tidak boleh kurang dari 40%. Bearden dan Fuquary (1984) menyatakan bahwa persentase spermatozoa hidup akan selalu lebih tinggi daripada motilitas spermatozoa.

Penambahan dosis rafinosa yang tidak tepat atau berlebihan akan menyebabkan perbedaan tekanan osmotik sehingga menyebabkan dehidrasi sel dan akan meningkatkan metabolisme spermatozoa yang mengakibatkan penumpukkan asam laktat sehingga membuat suasana tidak nyaman untuk spermatozoa dan menyebabkan kematian spermatozoa. 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 daya hidup spermatozoa, hal ini disebabkan karena dalam menghasilkan energi sukrosa

akan menghasilkan asam laktat yang lebih banyak sehingga bersifat toksik bagi spermatozoa.

### 3. Penilaian persentase abnormalitas spermatozoa selama pembekuan

Hasil penelitian rataan persentase abnormalitas spermatozoa selama pembekuan disajikan dalam Tabel 4. Hasil analisis ragam terhadap abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibrisasi, *prefreezing*, dan *post thawing motility* menunjukkan tidak berbeda nyata ( $P>0,05$ ). Kondisi ini menunjukkan bahwa dosis rafinosa di dalam pengencer tris kuning telur tidak memberikan pengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa. Hal ini diduga penambahan dosis rafinosa sampai 3% dalam bahan pengencer masih mampu mempertahankan struktur sel spermatozoa selama pembekuan.

Tabel 4. Hasil rataan persentase abnormalitas spermatozoa sapi Ongole

Rafinosa	Penilaian		
	Setelah Ekuilibrisasi	Setelah <i>Prefreezing</i>	POST THAWING MOTILITY
	-----%-----		
0,5%	2,23 ± 0,33	4,33 ± 2,58	1,68 ± 1,31
1,0%	3,48 ± 2,72	3,25 ± 1,49	1,70 ± 2,27
1,5%	2,50 ± 1,73	1,48 ± 1,40	1,35 ± 0,68
2,0%	3,10 ± 0,76	4,95 ± 2,59	1,80 ± 0,69
2,5%	3,43 ± 1,29	3,43 ± 1,59	1,30 ± 1,31
3,0%	3,38 ± 1,84	6,13 ± 3,08	0,95 ± 1,14

Abnormalitas spermatozoa yang didapat dalam penelitian ini adalah kepala kecil, kepala cabang, ekor putus, kepala putus, ekor melingkar, kepala pecah, dan ekor cabang. Abnormalitas dapat terjadi karena kelainan pada tubuli seminiferi dan gangguan testikuler, adanya kejutan dingin (*cold shock*) yang dialami oleh sperma, dan ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat proses metabolisme yang berlangsung. Siswanto dalam Setiono (2015) menyatakan bahwa perubahan tekanan osmotik ditandai dengan adanya peningkatan kejadian spermatozoa dengan ekor melingkar, menurunkan viabilitas, dan menurunkan integritas membran plasma spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa abnormalitas masih dalam kisaran normal. Selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi (Toelihere, 1993). Setiap spermatozoa yang abnormal tidak dapat membuahi sel telur, tanpa

memandang apakah abnormalitas tersebut terjadi di dalam tubuli seminiferi, dalam epididimis dan atau oleh perlakuan.

### SIMPULAN DAN SARAN

#### Simpulan

1. penambahan dosis rafinosa 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% dan 3,0% dalam bahan pengencer tris kuning telur berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibriasi dan persentase spermatozoa hidup setelah *prefreezing* serta memberikan pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap persentase spermatozoa hidup setelah ekuilibriasi, tetapi memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap persentase motilitas setelah *prefreezing*, *Post Thawing Motility*, dan persentase hidup spermatozoa *Post Thawing Motility* serta persentase abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibriasi, setelah *prefreezing*, dan *Post Thawing Motility*;
2. Penambahan dosis rafinosa berdasarkan uji polinomial ortogonal berpola regresi linier terhadap persentase motilitas setelah ekuilibriasi dengan persamaan  $\bar{y} = 65,58 - 2,36x$ , persentase spermatozoa hidup setelah ekuilibriasi dengan persamaan  $\bar{y} = 81,23 - 4,47x$ , dan persentase spermatozoa hidup setelah *prefreezing* dengan persamaan  $\bar{y} = 79,13 - 4,68x$ .

#### Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, saran yang dapat diberikan adalah perlu diadakan penelitian lebih lanjut terhadap pemberian dosis rafinosa kurang dari 0,5% dalam pengencer tris kuning telur terhadap motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa sapi Ongole.

### DAFTAR PUSTAKA

- Aerens, C.D., Ihsan, M.N., Isnaini, N. 2004. Perbedaan Kuantitatif dan Kualitatif Semen Segar pada Berbagai Bangsa Sapi Potong. Universitas Brawijaya. Malang
- Aini, K. 2014. Pengaruh Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses Pre Freezing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung
- 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-spermatozoa-limousin. pdf](http://elibrary.ub.ac.id/bitstream/123456789/21674/1/Pengaruh%20umur%20pejantan%20terhadap%20kualitas%20spermatozoa%20limousin.pdf). Diakses pada 8 Juni 2016
- Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung Tengah. 2010. Standar Operasional Prosedur. BIBD Lampung Tengah. Lampung Tengah
- Bearden, H. J. and J. W Fuquay. 1984. Applied Animal Reproduction. 2nd edition. Reston Publishing Company
- Fathul. F., Liman, N. Purwaningsih, dan S.Tantalo. 2013. Pengetahuan Bahan Pakan dan Formulasi Ransum. Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Garner dan Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez B, and Hafez E.S.E. Reproduction in Farm Animal. 7th Ed. USA
- Hafez, E. S. E. 1987. Reproduction in Farm Animal, 4th Edition, Lea and Fibiger. Philadelphia. USA
- \_\_\_\_\_. 2000. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animals. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland, USA
- Kayser, J.P., R.P. Amann, R.K. Shidefer, E.L. Squires, D.J. Jasko and B.W. Pickett. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology 30: 601—614
- Mansjur. 2001. Metabolisme: Karbohidrat, Protein, Asam Nukleat. Fakultas MIPA Institut Pertaian Bogor. Bogor
- Mukminat, A. 2014. Pengaruh Penambahan Berbagai Sumber Karbohidrat pada Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Mumu, M. I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simmental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektal Gliserol. Skripsi. Universitas Tadulako. Sulawesi Tengah
- Poedjadi, A. 1994. Dasar-dasar Biokimia. UI Press. Jakarta
- Rizal, M.A. dan Herdis. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Penerbit PT. Rineka Cipta. Jakarta
- Rizal, M., Herdis, A. Boediono, A.S. Aku dan Yulnawati. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Universitas Pattimura. Ambon 11 (2) : 123—130
- Salmah, N. 2014. Motilitas, Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Semen



- Beku Sapi Bali pada Pengencer Andromed dan Tris Kuning Telur. Skripsi Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Makassar
- Salmon, S. and W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77—111
- Salisbury, G. W. and N. L. VanDenmark. 1985. Fisiologi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (Physiologi and Artificial Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Djanuar, R. Gajah Mada University Press. Yogyakarta
- 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
- Subowo. 1995. Biologi Sel. Angkasa. Bandung
- Sugiarti, T., E. Triwulanningsih, P. Situmorang, R. G. Sianturi dan D. A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan Katalase dalam Produksi Semen Dingin Sapi. Puslitbang Peternakan. Bogor
- Supriatna I, dan Pasaribu FH. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Bogor: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Susilawati, T., P. Srianto, Hermanto dan E.Yuliani. 2003. Inseminasi Buatan dengan Spermatozoa Beku Hasil Sexing pada Sapi untuk Mendapatkan Anak dengan Jenis Kelamin Sesuai Harapan. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung
- \_\_\_\_\_. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa. Bandung