

Uji validasi formula pengencer spermatozoa nano-flavonoid tahan suhu ruang

Validation test of room temperature resistant nano-flavonoid spermatozoa diluent formula

Yeni Widyaningrum*, Shobihatul Fitriya, dan Dicky M. Dikman

Loka Penelitian Sapi Potong, Jln. Pahlawan 2 Grati, Pasuruan, Jawa Timur 67184

*Email Koresponden: drh.yeni@yahoo.com

Abstrak. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kualitas semen cair sapi POGASI yang menggunakan pengencer CEP dengan penambahan nano-flavonoid yang disimpan pada suhu yang berbeda selama jam ke-3. Materi penelitian menggunakan 10 ekor sapi POGASI jantan, ditampung dengan vagina buatan. Syarat semen segar yang digunakan adalah mempunyai motilitas progresif $\geq 70\%$. Terdapat 3 formula pengencer yaitu P0: pengencer CEP; P1 : CEP + nano-flavonoid 0,10 g; dan P2 : CEP + nano-flavonoid 0,15 g yang diuji cobakan dengan semen segar tersebut. Terdapat 2 perlakuan penyimpanan semen, yaitu pada suhu 3-5°C dan 26-28°C. Parameter yang diukur kualitas spermatozoa (motilitas spermatozoa, viabilitas, pH), kadar MDA, DNA fragmentasi, dan SEM. Penelitian diulang lima kali, dan dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA). Hasil sementara dari penelitian ini adalah pengencer spermatozoa baik formula 1, 2, dan 3 mampu menunjang daya hidup spermatozoa pada suhu 3 sampai 5°C selama penyimpanan jam ketiga dengan rata-rata tingkat motilitas dengan formulasi terbaik sementara yaitu perlakuan P1 berturut-turut adalah (68,3±6,5; 50,0±6,7; 52,2±2,2). Terbaik kedua sementara yaitu pengencer P2 dengan tingkat motilitas (56,6±4,7; 55,6±6,8; 46,1±7,9). Sedangkan pada suhu penyimpanan 26°C tidak dapat mendukung daya hidup spermatozoa sampai jam ke-3. Rataan motilitas spermatozoa sampai jam ke-2 dengan pengencer P1 (80,6±1,2; 76,3±0,7), dan kualitas motilitas perlakuan P1 tidak berbeda jauh tingkat motilitasnya yaitu sebesar (78,5±1,2; 78,5±1,2). Selanjutnya dapat disimpulkan sementara bahwa pengencer berbahan CEP yang ditambahkan nano-flavonoid, motilitas pada jam ke-2 masih di atas 45%.

Kata kunci: sapi PO POGASI, CEP, motilitas, nano-flavonoid

Abstract. The aim of this study was to evaluate the quality of liquid semen from POGASI cattle using CEP diluent with the addition of nano-flavonoids stored at different temperatures for 3 hours. The research material used 10 POGASI cattle, housed with an artificial vagina. The requirement for fresh cement to be used is to have progressive motility $>70\%$. There are 3 diluent formulas, namely P0: CEP diluent; P1: CEP + nano-flavonoids 0.10 grams; and P2: CEP + nano-flavonoid 0.15 grams which was tested with fresh semen. There are 2 cement storage treatments, namely at temperatures of 3-5°C and 26-28°C. Parameters measured were sperm quality (spermatozoa motility, viability, and kinetic parameters (motility, progressive motility, pH). MDA levels, DNA Fragmentase, and SEM,. The study was repeated five times, and analyzed using *analysis of variance* (ANOVA). The viability of spermatozoa at a temperature of 3-5°C during the third hour of storage with the average motility level with the temporary best formulation, namely treatment P1, respectively, was (68.3±6.5; 50.0±6.7; 52.2±2.2). motility level (56.6±4.7; 55.6±6.8; 46.1±7.9). Meanwhile, storage temperature of 26°C could not support spermatozoa viability until

the 3rd hour 76.3±0.7), and the motility quality of the P1 treatment did not differ much in terms of motility level, namely (78.5±1.2; 78.5±1.2). Furthermore, it can be concluded temporarily that the diluent made from CEP which added nano-flavonoids, the motility at the 2nd hour was still above 45%.

Keywords: PO POGASI cattle, CEP, motility, nano-flavonoids

PENDAHULUAN

Pelaksanaan inseminasi buatan (IB) di lapang tidak selamanya tanpa kendala teknis di lapang. Keberhasilan IB dipengaruhi oleh kualitas bahan yang digunakan untuk pengencer semen. Tujuan pengencer yaitu untuk mempertahankan kehidupan dan motilitas spermatozoa selama proses penyimpanan dan sampai saat ini sudah banyak dikembangkan. Beberapa fungsi dari pengencer diantaranya: menambah volume semen, *buffer* atau penyangga, sumber nutrisi, mencegah *cold chock*, mengandung antibiotik, menciptakan lingkungan yang kondusif, dan sebagai krioprotektan (Mato, Nalley, Hine, & Marawali, 2024).

Bahan yang dapat digunakan sebagai pengencer semen cair diantaranya: *tris aminomethane*, CEP-2, kuning telur, andromed, gliserol, etilen glikol, *dimethyl sulfoxide* (DMSO), kedelai, susu, air kelapa, ekstrak buah melon (Ratnawati, 2017). Pengkajian teknologi pengencer spermatozoa tahan suhu ruang mulai banyak dilakukan (Raseona et al., 2017). Konsep pengencer spermatozoa yang tahan suhu ruang mempunyai keunggulan diantaranya lebih efisien dalam penggunaan sarana prasarana untuk memproses semen. Teknologi ini sekaligus menjawab tantangan di lapang pada kondisi yang sulit untuk pembuatan semen beku maupun semen cair. Raseona et al. (2017) menyatakan bahwa tryladil dan CEP-2 mampu bertahan dalam suhu ruang (24°C). Formulasi pengencer dengan komposisi bahan yang tepat dan telah memenuhi standar komponen pengencer yang ideal diharapkan dapat mendukung daya hidup spermatozoa dalam suhu ruang (20 sampai 24°C).

Optimalisasi fungsi pengencer dapat dilakukan dengan menambahkan bahan aditif dalam pengencer. Banyak studi sebelumnya yang mengkaji berbagai bahan aditif untuk pengencer, diantaranya: antioksidan (vitamin A, E, C; glutation), vitamin B12, cytein, kolesterol, soy-lecitin, DHA, air kelapa (Raheja, Choudhary, Grewal, Sharma, & Kumar, 2018). Penambahan antioksidan untuk melindungi membran sel dan DNA spermatozoa agar tidak terjadi kerusakan, dengan adanya radikal bebas (ROS). Sumber antioksidan dapat ditemukan dari alam, seperti teh hijau (*Camellia sinensis*). ROS yang meningkat juga akan menurunkan produksi ATP di dalam mitokondria, akibatnya motilitas sperma menurun (Yeste, 2016).

Teh hijau mengandung komponen bioaktif yaitu polifenol yang memiliki aktivitas anti-oksidan yang sangat kuat. Flavonoid yang merupakan golongan terbesar dari polifenol yang juga sangat efektif sebagai antioksidan (Kusmiyati, Sudaryat, Lutfiah, Rustamsyah, & Rohdiana, 2015). Selain kandungan fruktosa di dalam teh hijau dapat digunakan spermatozoa sebagai tambahan sumber e-nergi. Selain itu, teh hijau juga mengandung beberapa jenis vitamin diantaranya adalah vitamin A, B1, B2, B3, B5, C, E, serta K (Nugraheni, Rachman, & Fadlan, 2022). Vitamin C dan E yang merupakan antioksidan yang mam-pu menetralsir radikal bebas. Sehingga perlu dilakukan penelitian penambahan ekstrak teh hijau pada pengencer spermatozoa guna mendukung kualitas spermatozoa tetap baik.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian adalah April - Desember 2021. Tempat pelaksanaan penelitian adalah di kandang percobaan dan laboratorium reproduksi Loka Penelitian Sapi Potong. Ekstraksi teh hijau di Gufron laboratorium, Malang. Analisa kualitas keutuhan membran dengan SEM atau TEM dilakukan di Biosain, Universitas Brawijaya. Analisis *Malondialdehyde dismutase* (MDA) dengan ELISA di Lab ADD, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Uji Validasi Formula Pengencer

Formula yang digunakan dalam kegiatan validasi:

Perlakuan	Bahan formulasi pengencer
Pengencer A	NaCl 0,9 g; KCl 0,05 g; CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ 0,04 g; MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ 0,08 g; NaHCO ₃ 0,1 g; NaH ₂ PO ₄ 0,1 g; KH ₂ PO ₄ 0,3; Fruktosa 0,3 g; Tris 1,6 g; asam sitrat 0,8 g; L-cystein; Rafinosa 0,2 g; penisilin 100.000 IU, streptomisin 100 mg; aquades 90 ml, kuning telur 1% dan nano albumin 10%.
Pengencer B	NaCl 0,9 g; KCl 0,05 g; CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ 0,04 g; MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ 0,08 g; NaHCO ₃ 0,1 g; NaH ₂ PO ₄ 0,1 g; KH ₂ PO ₄ 0,3; Fruktosa 0,3 g; Tris 1,6 g; asam sitrat 0,8 g; L-cystein; Rafinosa 0,2 g; penisilin 100.000 IU, streptomisin 100 mg; aquades 90 ml, ekstrak teh hijau 0.10 mg, kuning telur 1% dan nano albumin 10%.
Pengencer C	NaCl 0,9 g; KCl 0,05 g; CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ 0,04 g; MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ 0,08 g; NaHCO ₃ 0,1 g; NaH ₂ PO ₄ 0,1 g; KH ₂ PO ₄ 0,3; Fruktosa 0,3 g; Tris 1,6 g; asam sitrat 0,8 g; L-cystein; Rafinosa 0,2 g; penisilin 100.000 IU, streptomisin 100 mg; aquades 90 ml, ekstrak teh hijau 0.15 mg, kuning telur 1% dan nano albumin 10%.

Prosedur Pengenceran Semen

Semen segar yang telah dievaluasi kualitas spermatozoanya dengan tingkat motilitas progresif 70% dibagi menjadi tiga (kontrol, formulasi B, dan formulasi C). Semen yang didapatkan, dicampur dengan formula pengencer dengan konsentrasi 20 juta/ml menggunakan rumus pengenceran yang digunakan adalah $V1.M1 = V2.M2$. Penyimpanan campuran semen dan pengencer pada suhu ruang (26-28°C dan 5°C). Perlakuan tiga pengencer tersebut adalah sebagai berikut:

(P0) : Semen sapi POGASI + CEP

(P1) : Semen sapi POGASI + CEP + nano-flavonoid 0,10%

(P2) : Semen sapi POGASI + CEP + nano-flavonoid 0,15%

Observasi kualitas semen dilakukan harian meliputi parameter pH, motilitas, viabilitas, keutuhan membrane/SEM dan kadar MDA. Pengamatan kualitasnya dilakukan setiap hari selama 5 hari hingga persentase motilitas spermatozoa progresif $\leq 40\%$.

Metode Pengukuran Parameter

Data yang diambil meliputi: (1) pH, pengukuran dilakukan dengan kertas pH meter dan disesuaikan dengan standar warna yang tersedia (Dewi et al., 2012); (2) Motilitas spermatozoa, pemeriksaan motilitas menggunakan SCA v 2.1. Sampel sebanyak 3-4 μ l, diletakkan dalam *object glass* suhu 37°C dan tutup dengan *cover glass*. Setting perbesaran mikroskop 10 x 10 dengan fase kontras pH. Pasang *green filter* pada cermin reflektor kemudian sesuaikan dengan standar warna. Jumlah gambar yang diambil untuk setiap sampel adalah 5 gambar (*field*). Hasil analisa berupa nilai rata-rata ataupun nilai setiap gambar tersaji dalam *file excel* (Ratnawati, 2017); (3) Viabilitas, pemeriksaan dimulai dengan pembuatan preparat ulas dengan pewarnaan eosin-negrosin. Sebanyak 1 tetes sampel dan 1 tetes pewarna eosin negrosin diletakkan pada permukaan kaca obyek, dicampur kemudian diulas pada kaca obyek yang baru dan difiksasi dengan api. Pemeriksaan preparat ulas dengan mikroskop perbesaran 1.000 kali dan dihitung sampai dengan 100 spermatozoa (Priyanto, Budiyanto, Kusumawati, & Kurniasih, 2019). Spermatozoa mati berwarna merah dan spermatozoa hidup terlihat transparan (sebagian/semua). Jumlah spermatozoa yang hidup dipersentasikan dalam 100 spermatozoa yang diamati. (4) Kadar MDA, sampel pengencer dipreparasi dan dianalisis dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 (E0198Bo) (5) Keutuhan *membrane/SEM*, diawali dengan pembuatan ulas sampel pada *cover glass* dan kering anginkan pada suhu ruang. Preparasi dimulai dengan membuat ulasan campuran semen dan pengencer sebanyak 2-3 μ l pada *cover glass* dan kering anginkan. Sampel dimasukkan ke Lab. Biosains untuk dianalisa menggunakan *scanning electron microscope* (SEM).

Ekstraksi Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

Ekstrak daun teh hijau diperoleh dari daun teh kering yang didapatkan dari Kebun teh Wonosari, Lawang, Malang. Teh hijau diekstraksi dengan cara maserasi dalam pelarut etanol untuk mendapatkan hasil ekstrak cair dan kental, setelah itu untuk mendapatkan hasil yang padat dilakukan proses pengeringan beku (*freeze dry*) (Vladika, 2018).

Fraksinasi Nano-Flavonoid

Serbuk *green tea* diekstraksi dengan etanol 80% pada rasio 1:10 (w/v) menggunakan metode maserasi selama 24 jam dan 4 kali penggantian pelarut pada suhu ruang. Maserat difiltrasi dengan kertas saring Whatman No. 41. Hasil filtrasi dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* (Bunchi R-114) pada suhu 50-60 °C. Sebagian ekstrak yang didapat dilarutkan dengan aquades 1:10 (w/v) untuk digunakan dalam proses fraksinasi. Proses fraksinasi dilakukan dengan pelarut berbeda (heksan, etil asetat, etanol) secara bertingkat pada rasio 1:1 (v/v) selama 24 jam dan 4 kali penggantian pelarut di suhu ruang. Masing-masing filtrat hasil fraksinasi dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* (Bunchi R-114) pada suhu 50-60°C (Vladika, 2018).

Penentuan Total Flavonoid Content

Analisis *total flavonoid content* (TFC) ekstrak *green tea* dilakukan menggunakan metode kalorimetri dengan kuersetin sebagai standar. Untuk setiap sampel ekstrak atau standar, sebanyak 0,3 ml NaNO₂ 20% ditambahkan ke dalam 3 ml sampel (2.5 ml sampel ditambah 0.5 ml akuades) dan diinkubasi selama 6 menit. Setelah inkubasi, sebanyak 0.3 ml AlCl₃ 10% ditambahkan ke dalam campuran dan diinkubasi selama 6 menit. Selanjutnya, 4 ml NaOH 1 M dan 2,4 ml akuades ditambahkan ke dalam campuran dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi setiap sampel dibaca dengan Spektrofotometer UV-Visible (Genesys 10) pada panjang gelombang 350 nm. TFC dinyatakan sebagai milligram Quercetin Equivalents (mg QE) per gram *dry weight* (gram dw) dengan memodifikasi Li et al. (2007).

Pengukuran Nano-Flavonoid Ekstrak Teh Hijau

Nanopartikel ekstrak flavonoid dilakukan analisis distribusi ukuran partikel menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA; Zetasizer Nano Range, Malvern Instrumen).

Parameter yang Diukur

Parameter yang diukur pada penelitian, yaaitu: kualitas Spermatozoa (motilitas spermatozoa, dan viabilitas), serta kadar MDA, *Scanning Electron Microscopy-EDX* (SEM), dan DNA fragmentasi.

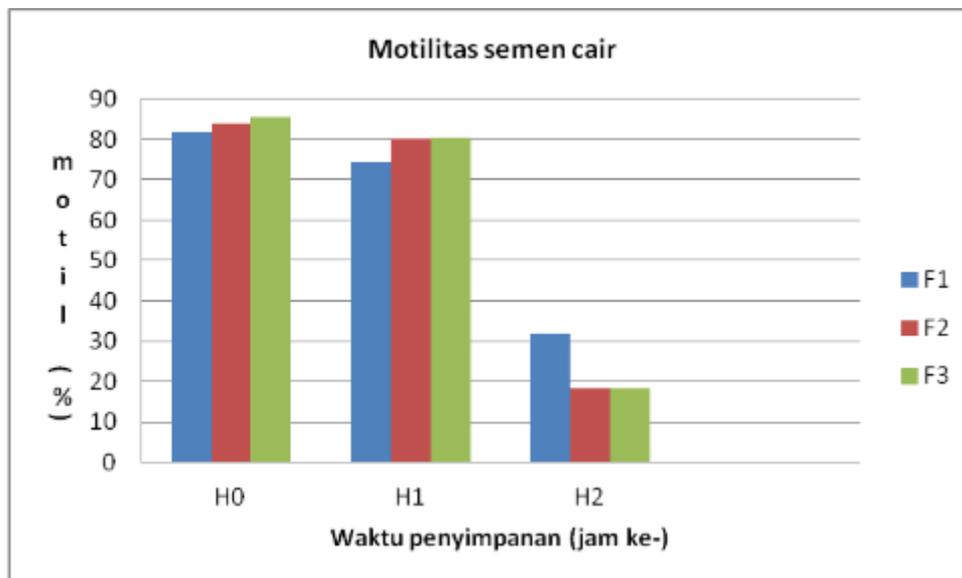
Analisis Data

Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap pola searah. Data dianalisis menggunakan *one way ANOVA SPSS*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Penambahan Nano-Flavonoid Terhadap Motilitas Semen Cair Sapi POGASI

Kualitas spermatozoa selama penyimpanan dengan berbagai formulasi pengencer, diketahui berdasarkan kemampuan spermatozoa untuk bergerak progresif. Motilitas spermatozoa yang layak untuk inseminasi buatan, yaitu lebih dari 50% gerakan progresif atau maju ke depan. Berdasarkan hasil pengamatan selama dua kali penampungan dan penyimpanan spermatozoa pada kedua suhu tersebut menunjukkan bahwa, kualitas spermatozoa masih dapat bertahan baik selama 24 jam. Motilitas sperma secara bertahap menurun seiring waktu penyimpanan, hal ini dikarenakan terjadi penipisan unsur hara pada pengencer. Motilitas spermatozoa dengan ketiga formulasi pengencer, pada suhu yang berbeda tertuang pada Gambar 1.



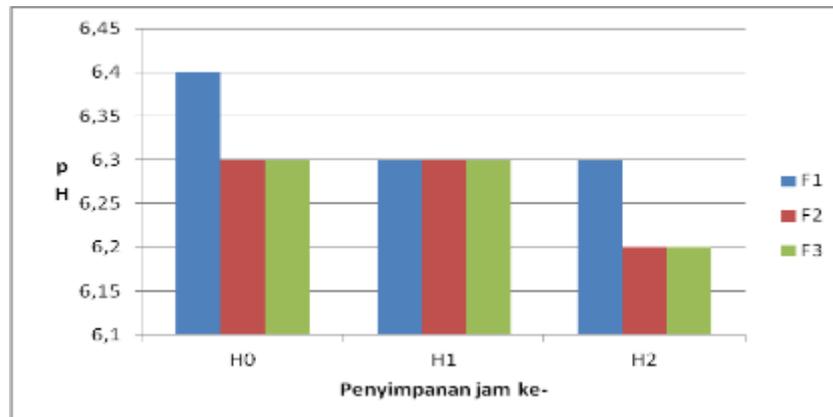
Gambar 1. Rataan sementara motilitas semen sapi POGASI yang dievaluasi pada suhu ruang terkontrol 26°C.

Hasil kualitas semen setelah diberi penambahan pengencer nano-flavonoid, menunjukkan perbedaan setiap perlakuan. Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan formula pengencer semen cair dengan tingkat motilitas yang baik formula (F3) di jam ke-0 sebesar 85,42 %, selanjutnya formula (F2) yaitu 84,01 %, kemudian formula (F1) 81,70 %. Sedangkan pada jam ke-1 menunjukkan bahwa F3 masih memiliki motilitas yang baik sebesar 80,59%, selanjutnya F2 yaitu 80.04%, dan F1 sebesar 74,44%. Namun pada jam ke-2 motilitas ketiga pengencer menurun masing-masing sebesar 31,87%, 18,40%, dan 18,30%. Motilitas sperma merupakan salah satu penentu keberhasilan spermatozoa mencapai sel telur di tuba falopi dan merupakan salah satu parameter untuk menilai kualitas spermatozoa untuk Inseminasi Buatan (IB).

Dilihat dari rata-rata pengamatan kualitas semen cair memenuhi standar untuk digunakan sebagai semen IB karena motilitasnya diatas 80% pada jam ke-0 dan jam ke-1. Sedangkan pada jam ke-2 kondisi semen yang tidak layak untuk IB, karena memiliki motilitas tidak kurang dari 40%. Motilitas sperma terbaik yang dapat digunakan standar IB dalam penelitian ini adalah penambahan nano-flavonoid 0.15%. Hasilnya menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa semen cair meningkat dengan penambahan antioksidan nano-flavonoid. Penambahan antioksidan nano-flavonoid ke dalam semen sapi POGASI adalah tepat karena meningkatkan persentase motilitas spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa kualitas semen akan menurun jika semen cair dengan pengencer yang tidak sesuai.

Pengaruh Penambahan Nano-Flavonoid terhadap Derajat Keasaman (pH) Semen Cair

Nilai pH semen cair dengan pengencer tanpa ditambahkan ekstrak dari green tea pada jam ke-0 sampai jam ke-2 rata-rata 6,3 sampai 6,4. Sedangkan pada formula pengencer yang ditambahkan nano-Flavonoid pada jam ke-0 dan jam ke-1 pH nya adalah 6.3, kemudian menurun di jam ke-2 menjadi 6.2. Hal ini terjadi juga pada formula pengencer ke-3 dengan penambahan nano-flavonoid 0.15% pH menurun dari 6.3 ke 6.2. Derajat keasaman (pH) pada ke-3 perlakuan menunjukkan bahwa masih pada nilai semen sapi normal berkisar antara 6,2 sampai 7,5. Derajat keasaman (pH) semen merupakan salah satu faktor pembatas kelangsungan hidup spermatozoa di dalam semen. Perubahan pH ke arah yang lebih asam (angka lebih kecil dari 7) akibat penimbunan asam laktat hasil metabolisme anaerob dapat menurunkan tingkat kelangsungan hidup spermatozoa (Rokana, Sayoga, Lisnanti, & Mukmin, 2023).



Gambar 2. Rataan sementara pH semen sapi POGASI yang dievaluasi pada suhu ruang terkontrol 26°C.

Penambahan Nano-Flavonoid Terhadap Viabilitas Semen Cair Sapi POGASI

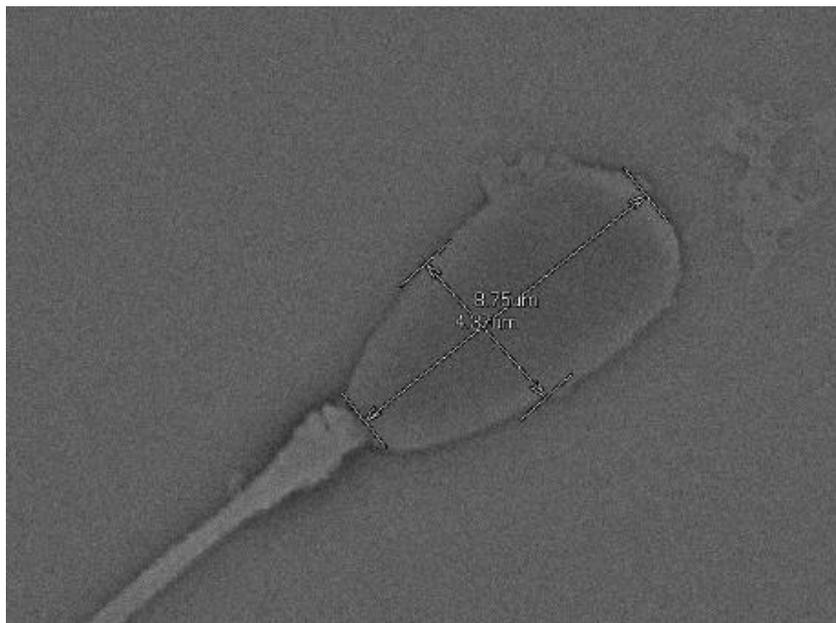
Salah satu kriteria penting dalam kemampuan fertilisasi selain motilitas, penilaian viabilitas spermatozoa juga sebagai metode pembeda yang paling signifikan guna mengetahui kualitas spermatozoa. Nilai rata-rata spermatozoa hidup dan mati perlakuan tanpa nano-flavonoid (F1) di suhu 3-5 °C pada jam ke-0 sampai jam ke-2 yaitu 88,5% ; 11,5%, 90,6%; 9,4%, dan 85,0% ; 15,0%. Sedangkan persentase spermatozoa yang hidup dan mati dengan pengencer nano-flavonoid 0,15% (F2) adalah sebagai berikut 89,9%; 10,1%; 85,1%; 14,9% menurun 71,2% ; 28,8%; dan F3 yaitu 88,8%; 11,2%; 79,7%; 20,3%, dan 46,7%; 53,3%. Spermatozoa dikatakan hidup apabila kepala sel sperma tampak berwarna putih, sedangkan kepala sel sperma yang mati tampak merah muda. Evaluasi spermatozoa menggunakan pewarnaan eosin-nigrosin, dimana spermatozoa yang tidak berwarna sel dianggap hidup, sedangkan sel yang diwarnai sebagian dan seluruhnya dianggap mati, karena terjadi kerusakan membran plasma yang kemudian memungkinkan pewarnaan dapat menembus membran (Atale, Gupta, Yadav, & Rani, 2014).

Penambahan Nano-Flavonoid Terhadap Membran Spermatozoa Semen Cair Sapi POGASI

Membran spermatozoa pada semen cair dengan pengencer berbahan nano-flavonoid, setelah diamati dengan menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) menunjukkan adanya perubahan pada membran spermatozoa. Pada jam ke-0 suhu 26-28°C dengan pembesaran 8.000 kali, menunjukkan sel spermatozoa sedikit mengalami perubahan di membrannya. Permukaan sel tampak adanya sedikit lesi pada membran spermatozoa dengan ukuran 4,42 $\mu\text{m} \pm 8,76 \mu\text{m}$ (Gambar 3). Sedangkan pada jam ke-2 suhu 26-28°C menunjukkan sel spermatozoa sedikit mengalami perubahan di membrannya, tampak ada pengelupasan sehingga tampak tidak mulus dan rata di bagian kepala. Ukuran sel spermatozoa sebesar 4,09 $\mu\text{m} \pm 8,56 \mu\text{m}$ (Gambar 4).

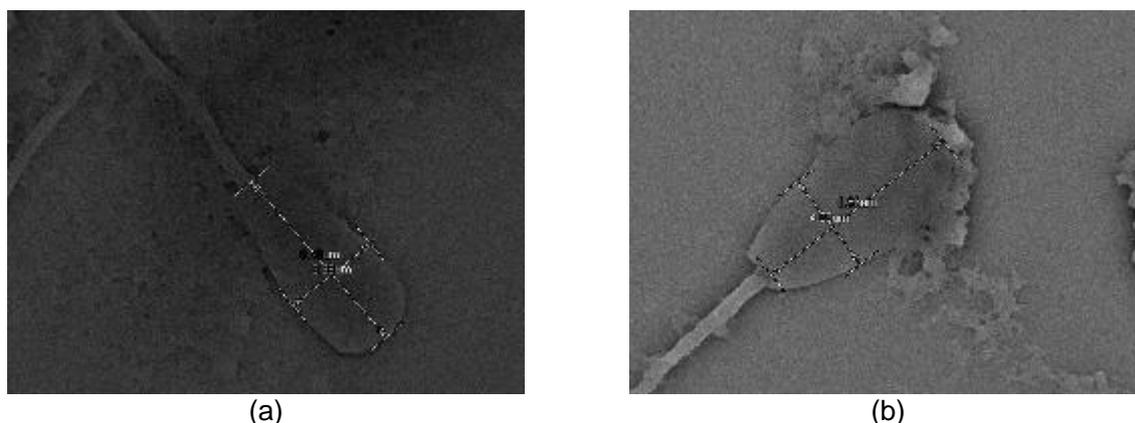


Gambar 3. Gambaran spermatozoa sel spermatozoa dengan pengencer nano-flavonoid pada jam ke-0 suhu 26 – 28 °C dilihat dengan SEM pembesaran 8.000 kali.



Gambar 4. Gambaran spermatozoa sel spermatozoa dengan pengencer nano-flavonoid pada jam ke-2 suhu 26-28°C dilihat dengan SEM pembesaran 8.000 kali.

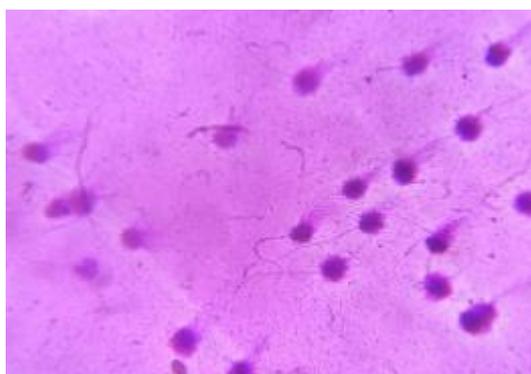
Gambaran sel spermatozoa pada semen cair dengan pengencer nano flavonoid pada suhu 3-5°C jam ke-0 menunjukkan permukaannya lebih mulus dan rata. Sedangkan jam ke-2 menunjukkan permukaannya lebih mulus dan rata, dengan ukuran $3,89 \mu\text{m} \pm 8,10 \mu\text{m}$ (Gambar 5). Sedangkan pada jam ke-2 menunjukkan sel permukaannya tidak mulus dan rata. Penyimpanan menyebabkan terjadinya sedikit kerusakan, diakibatkan oleh adanya stres oksidatif.



Gambar 5. Gambaran spermatozoa sel spermatozoa dengan pengencer nano-flavonoid pada jam ke-0 (a) dan jam ke-2 (b) suhu 3 – 5 °C dilihat dengan SEM pembesaran 8.000 kali.

Penambahan Nano-Flavonoid Terhadap Tingkat Kerusakan DNA Spermatozoa Semen Cair Sapi POGASI

Evaluasi tingkat kerusakan DNA spermatozoa dengan menggunakan kit Sperm-Bos-Halomax. Spermatozoa yang mengalami kerusakan DNA-nya berpedar, membentuk halo didaerah kepala spermatozoa. Sedangkan yang tidak mengalami kerusakan pada DNA-nya daerah kepala tidak berpedar. Berdasarkan bentuk halo dapat dibedakan menjadi dua kriteria yaitu yang berbentuk halo (berpedar) yang menunjukkan kerusakan DNA pada spermatozoa dan yang tidak menunjukkan halo (tidak berpedar) untuk DNA spermatozoa yang utuh. Hasil pemeriksaan kerusakan DNA spermatozoa formula 1 jam ke-0 sebesar 60,00% dan yang tidak terfragmentasi 40,00%. Sedangkan kerusakan DNA spermatozoa pada semen cair dengan penambahan nano-flavonoid 0,10 % sebesar 36,70 dan yang tidak terfragmentasi 63,30. Serta dengan penambahan nano-flavonoid 0,15%, DNA yang mengalami kerusakan lebih sedikit 36,67% dan yang tidak rusak 63,33%.



Gambar 6. DNA terfragmentasi menggunakan Sperm–Bos–Halomax.

Penyimpanan semen cair pada jam ke-2 menunjukkan hasil bahwa kerusakan DNA spermatozoa (terfragmentasi) lebih banyak dibandingkan jam ke-0, baik pada formula 1 maupun formula 3. Pada formulasi pengencer tanpa nano-flavonoid DNA yang rusak sebesar 97,84%, yang tidak terfragmentasi 2,16. Sedangkan kerusakan DNA pada formulasi dengan penambahan nano-flavonoid konsentrasi 0,10 % dan 0,15 % hampir sama yaitu 95,00% dan yang 5,00%. Berdasarkan hasil analisis dengan Sperm-Bos-Halomax menunjukkan kerusakan DNA pada semen cair yang disimpan dengan bahan pengencer nano-flavonoid lebih sedikit jam ke-0 sebesar 36,67% dan jam ke-2 sebesar 95,00%. Nano-flavonoid sebagai antioksidan eksogen yang ditambahkan pada pengencer spermatozoa, mampu meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan memperbaiki aktivitas mitokondria. Selain itu, adanya antioksidan dapat

memperbaiki polimorfisme gen-gen pengkode enzim antioksidan dan meningkatkan aktivitas pengikatan ROS oleh enzim antioksidan.

Tabel 2. Parameter kualitas DNA spermatozoa semen cair pada beberapa formula pengencer

Parameter	DNA Fragmentasi (%)		DNA Non-Fragmentasi (%)	
	Jam ke-0	Jam ke-2	Jam ke-0	Jam ke-2
Formulasi tanpa nano-flavonoid (F1)	60,00 : 180	97,84 : 293,5	40,00 : 120	2,16 : 6.5
Formulasi dengan nano-flavonoid 0,10% (F2)	66,67 : 200	33,33 : 286	33,34 : 100	4,60 : 14
Formulasi dengan nano-flavonoid 0,15% (F3)	36,66 : 110	95,00 : 285	63,33 : 190	5,00 : 15

Beberapa penelitian melaporkan tingkat kerusakan DNA spermatozoa atau Sperm DNA Fragmentasi Indeks (SDFi) tertinggi yang ditemukan pada spermatozoa sapi sekitar 7% sampai 10% dapat digunakan sebagai indikator keberhasilan inseminasi buatan yang paling rendah (Prabowo, Bintara, Yusiati, Sitaresmi, & Widayati, 2023). Meseguer et al. (2011) menyatakan kerusakan DNA spermatozoa menyebabkan kegagalan kebuntingan sebesar 6,9% dan sisanya disebabkan oleh faktor lain. Menurut Yin, Zhu, Luo, & Xia (2020), kerusakan DNA spermatozoa akan berdampak negatif terhadap fertilisasi dan perkembangan embrio.

KESIMPULAN

Semen sapi POGASI dapat disimpan dengan pengencer berbahan CEP baik yang tidak ditambahkan nano-flavonoid maupun yang diberi nano-flavonoid, disimpan pada suhu 5°C bertahan selama jam ke-2. Sedangkan pada suhu ruang terkontrol 26°C belum dapat menunjang kehidupan spermatozoa, kualitas spermatozoa baik pada jam ke-1. Kerusakan DNA Spermatozoa dengan penambahan nano-flavonoid 0,15%, DNA yang mengalami kerusakan lebih sedikit 36,67% dan yang tidak rusak 63,33%. Sel spermatozoa pada semen cair dengan pengencer nano-flavonoid pada suhu 3-5°C jam ke-0 menunjukkan permukaan selnya lebih mulus dan rata. Sedangkan jam ke-2 menunjukkan permukaan selnya lebih mulus dan rata, dengan ukuran $3,89 \mu\text{m} \pm 8,10 \mu\text{m}$

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada staf teknisi Laboratorium Reproduksi, Kandang Produksi Loka Loka Pengujian Standar Instrumen Ruminansia Besar di Grati – Pasuruan yang sudah banyak membantu dalam kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Atale, N., Gupta, S., Yadav, U. C. S., & Rani, V. (2014). Cell-death assessment by fluorescent and nonfluorescent cytosolic and nuclear staining techniques. *Journal of Microscopy*, 255(1), 7–19.
- Kusmiyati, M., Sudaryat, Y., Lutfiah, I. A., Rustamsyah, A., & Rohdiana, D. (2015). Aktivitas antioksidan, kadar fenol total, dan flavonoid total dalam teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) asal tiga perkebunan Jawa Barat. *Jurnal Penelitian Teh Dan Kina*, 18(2), 101–106.
- Li, W., Dai, R.-J., Yu, Y.-H., Li, L., Wu, C.-M., Luan, W.-W., ... Deng, Y.-L. (2007). Antihyperglycemic effect of cephalotaxus sinensis leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), 1123–1129. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.1123>
- Mato, S. I., Nalley, W. M., Hine, T. M., & Marawali, A. (2024). Perbandingan kualitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer dasar natrium chloride fisiologis dengan level kuning telur yang berbeda. *COMSERVA: Jurnal Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, 4(1), 32–44. <https://doi.org/https://doi.org/10.22146/jsv.352>

- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., García-Herrero, S., Remohí, J., & Fernandez, J. L. (2011). Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertility and Sterility*, *95*(1), 124–128. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.05.055>
- Nugraheni, Z. V., Rachman, T. M., & Fadlan, A. (2022). Ekstraksi senyawa fenolat dalam daun teh hijau (*Camellia sinensis*). *Akta Kimia Indonesia*, *7*(1), 69–76.
- Prabowo, T. A., Bintara, S., Yusiati, L. M., Sitaresmi, P. I., & Widayati, D. T. (2023). Evaluation Deoxyribonucleic acid (DNA) fragmentation of local Indonesian cattle frozen sperm using Halomax method. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, *24*(4), 2225–2230. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d240435>
- Priyanto, L., Budiyanto, A., Kusumawati, A., & Kurniasih, K. (2019). Kerusakan deoxyribonucleic acid (DNA) spermatozoa memengaruhi tingkat kebuntingan Sapi Brahman. *Jurnal Veteriner*, *20*(1), 119–124. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.1.119>
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., & Kumar, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, *6*(3), 239–245.
- Raseona, A. M., Ajao, O. A., Nethengwe, L. ., Madzhie, L. ., Nedambale, T. L., & Barry, D. M. (2017). Viability of bull semen extended with commercial semen extender and two culture media stored at 24°C. *South African Journal of Animal Science*, *47*(1), 49–55. <https://doi.org/10.4314/sajas.v47i1.8>
- Ratnawati, D. (2017). *Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa Semen Cair Pada Tiga Bangsa Sapi Lokal Dengan Tiga Pengencer Berbeda Selama Simpan Dingin*. Universitas Brawijaya, Malang.
- Rokana, E., Sayoga, Y. A., Lisnanti, E. F., & Mukmin, A. (2023). Effect of adding coconut water (*Cocus viridis*) on liquid semen quality of kacang goats (*Capra aegagrus hircus*) stored at 4-5°C. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, *11*(2), 141–158.
- Vladika, M. A. (2018). *Pengaruh penambahan ekstrak teh hijau (Camellia sinensis) dalam bahan pengencer susu skim terhadap kualitas spermatozoa Domba Sapudi yang disimpan pada suhu dingin*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, *85*(1), 47–64.
- Yin, Y., Zhu, P., Luo, T., & Xia, X. (2020). Association of single-nucleotide polymorphisms in antioxidant genes and their gene-gene interactions with risk of male infertility in a Chinese population. *Biomedical Reports*, *13*(1), 49–54. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1306>