

**PENGARUH BAHAN PENGECER SARI KACANG KEDELAI (*Glycine max*)
TERHADAP VIABILITAS DAN NEKROSIS SPERMATOZOA
DOMBA SAPUDI**

**THE EFFECT OF SOYA BEAN(*Glycine max*) EXTRACT IN SPERM DILUTER
TO THE SPERM VIABILITY AND NECROSIS IN SAPUDI RAM**

Kicky Hanis Immelda¹⁾, *Suherni Susilowati²⁾, Ira Sari Yudaniayanti³⁾

¹⁾Student, ²⁾Veterinary Reproduction Department, ³⁾Klinik Department

Faculty Veterinary Medicine, Universitas Airlangga

*Corresponding author: suhernifkhunair@gmail.com; parkbogummy14@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of study was to find out the effect of different concentrations of soya bean extract in sperm diluter, stored at 5°C toward sperm viability and necrosis. The semen was divided into four groups : P0: 0.1 ml sapudi ram + 1 ml of diluent yolk citrate, P1: sapudi ram 0.1 ml + 1 ml diluent soybeans extract konsentration 5%, P2: 0.1 ml sapudi ram + 1 ml diluent soybeans extract konsentration 10%, P3: 0.1 ml sheep semen + 1 ml diluent soybeans konsentration 15%. The result showed that the dose of soya bean extract diluter konsentration of 15% could increase the viability percentage and could decrease the necrosis percentage of sperm.

Key words : egg yolk citrate, soya bean extract, sapudi ram, sperm quality.

Pendahuluan

Ternak domba (*Genus ovis*) merupakan jenis ternak yang sudah lama dikenal masyarakat Indonesia. Salah satu keunggulan ternak domba adalah mudah dipelihara, produktivitas cepat, dan harganya relatif terjangkau sehingga berpotensi untuk dikembangkan. Pengembangan dapat melalui peningkatan kualitas pejantan unggul untuk pembibitan. Pejantan unggul yang sehat fisik dan reproduksi akan menghasilkan spermatozoa yang baik untuk menghasilkan anak yang baik (Afiati dkk., 2013).

Salah satu cara untuk meningkatkan sifat genetik ternak domba dengan melaksanakan atau melakukan cara Inseminasi Buatan (IB). Keberhasilan pelaksanaan Inseminasi Buatan (IB) ditentukan salah satunya oleh kualitas semen yang digunakan, maka sebelum digunakan untuk inseminasi semen perlu dicirikan terlebih dahulu. Semen yang tidak dicirikan akan sukar mempertahankan hidupnya lebih dari 24jam, walaupun disimpan dalam suhu 0°C sampai 5°C (Partodiharjo, 1992). Dalam proses pembuatan semen beku, nutrisi yang terdapat

pada pengencer yang digunakan sangat berperan penting dalam melindungi spermatozoa. Oleh sebab itu, pengencer harus mampu menyediakan bahan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa, melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*), berfungsi sebagai buffer atau penyangga untuk mencegah perubahan pH, dan lain sebagainya (Arifiantini dan Yusuf, 2004).

Bahan pengencer semen harus mempunyai kriteria tidak beracun, berenergi, mampu mempertahankan kualitas semen, bersifat sebagai pelindung, buffer, antibiotika, isotonis, keseimbangan mineral dan krioprotektan yang baik untuk kehidupan spermatozoa, dan bahan anti *cold shock* (Hardijanto dkk. 2010).

Kedelai (*Glycine max L. Merr*) merupakan salah satu komoditas tanaman pangan nabati yang cukup diminati oleh masyarakat. Alasan kedelai diminati antara lain karena dalam biji kedelai terkandung zat gizi yang tinggi terutama protein dengan kualitas yang mendekati daging hewan. Di antara kacang-kacangan, kadar protein kedelai memang yang paling tinggi (Rukmana dan Yuniarsih, 1996).

Kandungan sari kedelai dalam pengencer seperti lesitin terbukti dapat melindungi dan menekan angka abnormalitas spermatozoa selama masa penyimpanan mengurangi kontaminasi mikroorganisme pada spermatozoa. Sari kedelai juga diketahui memiliki kecenderungan terkontaminasi bakteri lebih kecil daripada kuning telur dan air susu sapi sehingga menekan angka abnormalitas lebih kecil. Menurut penelitian Bousseau dkk. (1998) bahwa tidak ditemukannya mikroorganisme yang membahayakan bagi spermatozoa pada pengencer yang mengandung lesitin. Hal ini didukung oleh penelitian Aries dkk.(2003) bahwa lesitin dari kacang kedelai memiliki bahan yang mirip dengan lesitin dari kuning telur, berperan melindungi integritas selubung protein sel spermatozoa sehingga lebih tahan terhadap pengaruh *cold shock*. Aku dkk. (2007) menambahkan bahwa penggunaan lesitin nabati mengurangi efek cekaman dingin serta lipoprotein dan lesitin nabati seperti kacang kedelai, sedangkan kuning telur dan susu terkontaminasi oleh bakteri dan mycoplasma.

Kualitas spermatozoa yang baik dipengaruhi oleh motilitas dan viabilitas, karena sangat berpengaruh bagi spermatozoa untuk mencapai tempat pembuahan (Hafez, 2000). Kerusakan selama pembekuan umumnya terjadi pada membran plasma maupun inti spermatozoa atau yang disebut dengan nekrosis, kerusakan pada inti spermatozoa dapat menyebabkan mutasi gen (Edinger dan Thompson, 2004).

Berdasarkan uraian diatas maka peneliti ingin meneliti apakah terdapat pengaruh bahan pengencer sari kacang kedelai terhadap viabilitas dan nekrosis spermatozoa domba.

Materi Dan Metode

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Unair untuk menampung semen dan Laboratorium Inseminasi Buatan (IB) Departemen Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Metode Penelitian

Penampungan Semen Domba Sapudi

Semen yang di tampung berasal dari domba Sapudi yang sehat dan tidak memiliki kecacatan serta kondisi alat reproduksinya baik. Penampungan dilakukan pada pagi hari dengan menggunakan vagina buatan kemudian, semen yang diperoleh diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, bau, warna, konsistensi dan pH serta pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, viabilitas, konsentrasi, dan uji resistensi.

Pembuatan Pengencer Kuning Telur Sitrat

Pengencer kuning telur sitrat dalam penelitian ini sebagai kontrol. Kuning telur yang akan dipakai berasal dari kuning telur ayam ras. Kuning telur sitrat merupakan pengencer kuning telur yang ditambahkan larutan natrium sitrat. Larutan tersebut berasal dari natrium sitrat dan aquades yang telah dihomogenkan.

Pembuatan Pengencer Sari Kacang Kedelai

Cara pembuatan sari kacang kedelai sebagai berikut :

Kacang kedelai yang akan di ambil sarinya dipisah dari kulitnya dan ditimbang dengan 3 macam perbandingan yaitu 12,5 gram, 25 gram, dan 37,5 gram. Kemudian direndam dengan air panas selama 15 menit dan tiriskan untuk memudahkan proses penggilingan. Kacang kedelai yang digiling kemudian di ditambahkan aquadest 250 ml. Setelah halus kemudian kacang kedelai disaring dan ditambahkan natrium sitrat dengan perbandingan 1:1 lalu diperiksa pHnya (pH 7) .Lalu tambahkan antibiotika penicilin 1000 IU dan streptomycin 1 mg ditambahkan kedalam setiap milliliter pengencer kacang kedelai dan di aduk sampai homogen. Selanjutnya diberi perlakuan yaitu P0, P1, P2 dan P3.

Prosedur Pengenceran Semen

Sampel semen segar di ambil 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang masing- masing telah diberi label kemudian di encerkan dengan kuning telur sitrat dan sari kacang kedelai berbagai konsentrasi dan perbandingan 1:10 adalah:

- P0 : 0,1 ml semen domba sapudi +1 ml pengencer kuning telur sitrat
- P1 : 0,1 ml semen domba sapudi +1 ml bahan pengencer sari kacang kedelai dengan konsentrasi 5%
- P2 : 0,1 ml semen domba sapudi +1 ml bahan pengencer sari kacang kedelai dengan konsentrasi 10%
- P3 : 0,1 ml semen domba sapudi +1 ml bahan pengencer sari kacang kedelai dengan konsentrasi 15%

Penentuan dosis dikutip dari skripsi Danik (2013).

Campuran semen dan pengencer di simpan pada suhu 5°C di dalam lemari pendingin dan dilakukan pemeriksaan 24jam terhadap viabilitas dan nekrosis spermatozoa .

Pemeriksaan Viabilitas

Pemeriksaan persentase spermatozoa hidup dan mati menggunakan zat eosin negrosin. Spermatozoa yang tidak menyerap zat warna dinyatakan spermatozoa hidup. Sebaliknya, spermatozoa yang menyerap zat warna dinyatakan spermatozoa mati. Spermatozoa hidup memiliki membran yang baik sehingga zat warna akan kesulitan menembus membran spermatozoa, hal tersebut membuat spermatozoa tetap berwarna jernih (Susilowati dkk., 2010).

Pemeriksaan Nekrosis

Pemeriksaan nekrosis spermatozoa menggunakan pewarnaan *Hematoxylin Eosin*. *Hematoxylin* bekerja sebagai pewarna basa artinya zat ini mewarnai unsur basofilik. *Hematoxylin* memulas inti (*nucleus*) menjadi berwarna biru. *Eosin* bersifat asam sehingga memulas sitoplasma sel menjadi berwarna merah. Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* merupakan jenis pewarnaan rutin yang paling umum digunakan (Damayanti dkk., 2011. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dan dihitung persentase spermatozoa yang mengalami nekrosis. Sel yang mengalami nekrosis dapat dilihat dari keadaan nukleus atau inti sel. Inti sel pada sel yang mengalami nekrosis dapat berupa *piknosis* (inti sel memadat), *karioreksis* (inti sel terkoagulasikan), dan *kariolisis* (inti sel memudar atau mengalami lisis).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini dibutuhkan semen segar domba Sapudi. Semen segar domba Sapudi yang di ambil semennnya diperiksa terlebih dahulu secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil pemeriksaan semen segar domba Sapudi dapat dilihat pada tabel berikut.

Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa Domba Sapudi

Pemeriksaan daya hidup (viabilitas) spermatozoa dilakukan menggunakan preparat pewarnaan *eosin-negrosin* dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x (objek x okuler = 40 x 10). Spermatozoa yang hidup tidak akan terwarnai oleh zat warna, sedangkan spermatozoa yang mati akan terwarnai merah keunguan.

Berdasarkan *Analisis of Variance* (ANOVA) satu arah yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan terhadap daya hidup (viabilitas) spermatozoa menunjukkan P0 tidak berbeda nyata dengan P2 tetapi berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan kelompok perlakuan P1 dan P3. Rerata dan standar deviasi persentase spermatozoa domba Sapudi tersaji dalam tabel 2.

Hasil uji ANOVA terhadap persentase nekrosis spermatozoa domba Sapudi setelah perlakuan menunjukkan P0 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan P3, tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan P1 dan P2. Pada pemeriksaan nekrosis menunjukkan P3 berbeda nyata dengan P0, P1, dan P2. Berdasarkan tabel presentase nekrosis spermatozoa domba Sapudi dapat di lihat pada Gambar 2.

Evaluasi semen domba segar perlu dilakukan untuk mengetahui kualitas semen yang akan digunakan dalam program Inseminasi Buatan (IB). Pemeriksaan kualitas semen segar juga dilakukan karena dapat digunakan untuk menentukan kadar pengencer yang dibutuhkan. Pemeriksaan semen domba segar digolongkan dalam 2(dua) kelompok, yakni makroskopis dan mikroskopis. Dalam penelitian ini kualitas semen domba segar yang dievaluasi secara makroskopis meliputi bau, pH, warna, konsistensi dan volume. Sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi motilitas, gerak

Penentuan presentase spermatozoa hidup dapat menggunakan rumus :

$$\% \text{ viabilitas spermatozoa} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Total spermatozoa hidup yang di amati adalah 100 sel spermatozoa

Persentase nekrosis spermatozoa dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Persentase Nekrosis} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang nekrosis}}{\text{total spermatozoa hidup}} \times 100\%$$

Tabel 1. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis spermatozoa domba Sapudi sebelum perlakuan

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	0,96
Bau	Khas
Warna	Krem
pH	6-7
Konsistensi	Kental
Konsentrasi (Juta/ml)	2780
Spermatozoa Hidup (%)	92,2
Spermatozoa Abnormal (%)	3,2
Gerak Individu	Progresif
Gerak Massa	+++

Keterangan : pH = power of Hydrogen

+++ = Gelombang kecil sampai besar yang tebal dangelombang dalam jumlah banyak dan cepat.



Gambar 1. Pada keterangan gambar di atas menunjukkan spermatozoa yang hidup ditandai dengan panah berwarna kuning, dan spermatozoa yang mati ditandai dengan panah berwarna merah.

massa, konsentrasi spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup (Rizal dan Herdis, 2008).

Pengaruh pemberian bahan sari kacang kedelai terhadap spermatozoa domba Sapudi dapat meningkatkan viabilitas karena menurut Toelihere (1985)

bahan pelindung spermatozoa selama penyimpanan dalam suhu dingin adalah lesitin. Sumber lesitin yang utama telah lama di gunakan adalah kuning telur sebab dapat mempertahankan kualitas semen mamalia serta mencegah efek dari cold shock dan terjadinya resiko kontaminasi

mikroorganisme yang membahayakan spermatozoa dan saluran reproduksi betina. Namun Bousseau *et al.* (1998) memban-

dingkan berbagai jenis pengencer dengan sumber lipoprotein dan lesitin

Tabel 2. Rerata dan Standart Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa Domba Sapudi Setelah Perlakuan

Perlakuan	Ulangan (n)	Viabilitas Spermatozoa
P0	6	80,0 ^b ± 2,19
P1	6	72,8 ^a ± 4,83
P2	6	80,1 ^b ± 2,40
P3	6	84,3 ^c ± 1,96

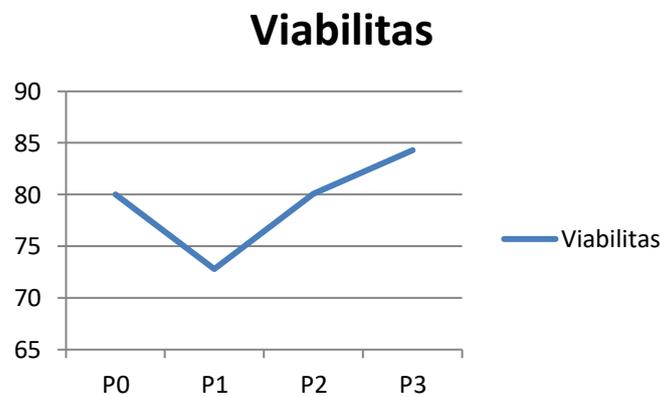
Superskripsi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Keterangan : P0 = 0,1 ml semen domba + 1 ml pengencer kuning telur sitrat

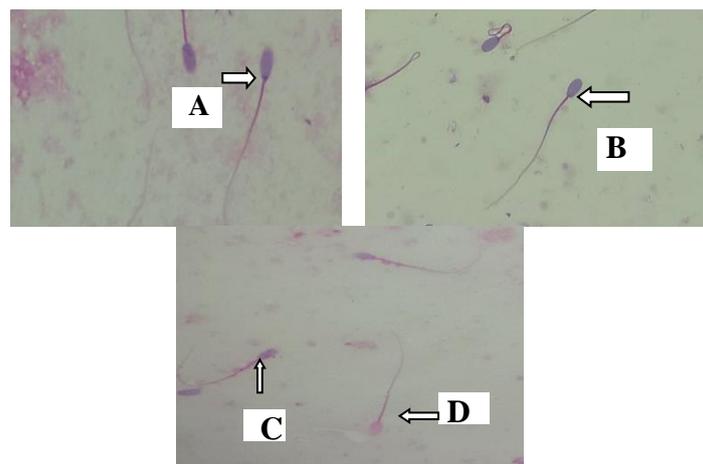
P1 = 0,1 ml semen domba + 1 ml pengencer sari kacang kedelai konsentrasi 5%

P2 = 0,1 ml semen domba + 1 ml pengencer sari kacang kedelai konsentrasi 10%

P3 = 0,1 ml semen domba + 1 ml pengencer sari kacang kedelai konsentrasi 15%



Gambar 2. Grafik Rata-rata Persentase Viabilitas Domba Sapudi



Gambar 3. Pemeriksaan nekrosis spermatozoa domba Sapudi dengan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*), perbesaran 400x.

Keterangan : A : Spermatozoa yang mengalami nekrosis dengan inti piknotis

B : Spermatozoa yang tidak mengalami nekrosis

C : Spermatozoa yang mengalami nekrosis dengan inti karioreksis

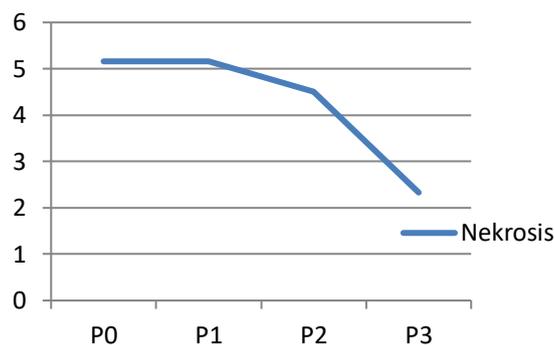
D : Spermatozoa yang mengalami nekrosis dengan inti kariolisis

Tabel 3. Rerata dan Standart Deviasi Presentase Nekrosis Spermatozoa Domba Sapudi setelah perlakuan

Perlakuan	Ulangan	Nekrosis Spermatozoa
P0	6	5,16 ^b ± 1,94
P1	6	5,16 ^b ± 1,60
P2	6	4,5 ^b ± 0,83
P3	6	2,33 ^a ± 0,81

Superskrip pada kolom yang sama dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Nekrosis

**Gambar 4.** Grafik Rata-rata Persentase Nekrosis Domba Sapudi

dalam kuning telur masih mengandung bakteri dan *mycoplasma* sedangkan yang menggunakan lipoprotein dan lesitin nabati yang terdapat pada sari kacang kedelai tidak di temukan bahaya mikroorganisme yang membahayakan spermatozoa.

Berdasarkan hasil pemeriksaan presentase pengaruh bahan pengencer sari kacang kedelai pada semen domba sapudi terhadap viabilitas spermatozoa menunjukkan hasil terbaik pada kelompok P3 dengan rata-rata dan standard deviasi yaitu menunjukkan 84,3 di banding dengan kelompok perlakuan P0, P1 dan P2. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh bahan pengencer sari kacang kedelai dengan konsentrasi 15% [0,1 semen domba sapudi+1ml bahan pengencer kacang kedelai(37,5)gram + 250ml aquadest)] dapat meningkatkan kualitas viabilitas domba sapudi.

Hasil penelitian Aku (2005) menyatakan bahwa lesitin kacang kedelai mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral(natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol,

lemak, lesitin, dan gliserilfosforil kolin (GPC).

Nekrosis Spermatozoa Domba Sapudi

Nekrosis atau kematian sel sebagai akibat adanya kerusakan sel akut atau trauma (misal: kekurangan oksigen, perubahan suhu yang ekstrim, cedera mekanis). Menurut Feitosa *et al.* (2008) nekrosis ditandai sebagai akibat cedera sel yang menyebabkan volume sel dan pecahnya membran. Kerusakan pada membran plasma spermatozoa dapat menginduksi terjadinya nekrosis spermatozoa.

Persentase nekrosis spermatozoa diuji menggunakan pewarnaan HE (*Hematoxylin Eosin*). Prinsip pada pewarnaan HE yaitu *hematoxylin* bersifat basa yang mewarnai unsur basofilik, memulas inti (*nucleus*) menjadi warna biru. *Eosin* bersifat asam sehingga memulas sitoplasma sel menjadi warna merah (Damayanti dkk., 2011). Secara mikroskopis, nekrosis menyebabkan berbagai macam tahapan perubahan morfologi pada inti, yaitu terlihat memadat berwarna gelap (piknotis),

kemudian inti terfragmen-fragmen menjadi pecahan kecil-kecil (karyoreksis), dan terakhir inti menjadi memudar dan pucat tidak terwarnai (karyolisis) (Soemirat, 2005).

Hasil pemeriksaan presentase nekrosis spermatozoa pada domba Sapudi, angka rata-rata dan standard deviasi pada kelompok perlakuan P3 yaitu menunjukkan 2,33. Pemberian pengaruh bahan pengencer sari kacang kedelai pada konsentrasi 15% (37,5 gram kacang kedelai + 250 aquadest) pada P3 menghasilkan nekrosis terendah dan berbeda nyata dengan P0, P1, dan P2. Perlakuan kelompok P3 terbukti menurunkan jumlah nekrosis spermatozoa domba, karena kacang kedelai memiliki kandungan gizi yang baik dengan kandungan protein 11 kali lebih tinggi sehingga sangat berguna bagi spermatozoa. (Rizal dkk., 2003).

Kesimpulan

Pemberian bahan pengencer sari kacang kedelai sirat dengan konsentrasi tertinggi yaitu 15% pada penelitian ini dapat meningkatkan viabilitas dan menurunkan nekrosis pada spermatozoa domba sa pudi.

Saran

Saran yang dapat di ambil dari penelitian ini adalah bahan pengencer sari kacang kedelai sirat dapat digunakan sebagai bahan pengencer semen domba dan disarankan untuk diadakan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahan pengencer sari kacang kedelai sirat pada semen beku domba sapudi.

Daftar Pustaka

- Afiati F, Herdis, dan S Said. 2013. Pembibitan Ternak dengan Inseminasi Buatan. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Arifiantini RI. dan Yusuf TL. 2004. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi Frisien Holstein. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bousseau, S., J.P. Brillar, B.M. Le Guine, B. Guine, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparasion Bacteriological Qualities of Various Egg Yolk Sources and the In Vitro and In Vivo Fertilizing Potential of Bovine in Egg Yolk and Lecitin-based Diluents. *Theriogenology*. 50: 699-706.
- Damayanti, A., F. Lupita, Kurniawan, Regina, dan Yenny. 2011. Pewarnaan Histologi. Akademi Analis Kesehatan Nasional. Surakarta.
- Edinger, A. L. and Thompson CB. 2004. Death by Design : Apoptosis, Nekrosis and Authophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 16: 663-669.
- Hafez, E. S. E. 2000. Semen Evaluation. In: *Reproduction In Farm Animals*. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA.
- Hardijanto, S. Susilowati, T. Sardjito, T. Hernawati, dan T. W. Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya. 15-38, 82-91.
- Margaret Danik, M. 2013. Pengaruh Berbagai Presentase Pengencer Kacang Tanah Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa
- Partodiharjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. Jakarta Pusat. 545-553.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B Purwantara dan P. Situmorang . 2003. Kriopreservasi semen Domba Garut dalam pengencer Tris dan Konsentrasi Laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan*. 19(2): 79-83.
- Rizal, M., dan Herdis. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Penerbit Penebar Swadaya. Jakarta.
- Rukmana, R. dan YYuniarsih., 1996. Kedelai Budidaya dan pasca panen. Kanisius, Yogyakarta.
- Soemirat, J. 2005. Toksikologi Lingkungan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Susilowati S, Hardijanto, T. W. Suprayogi, T. Sardjito, T. Hernawati. 2010. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya.
- Toelihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa Bandung. 93-100, 116-128.