

RESEARCH ARTICLE

The Effect of Giving The Antioxidant Vitamin C in Tris-Egg Yolk Extender During The Preservation Period on The Quality of The Epididymal Spermatozoa of Mice (*Mus musculus L.*)

(Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dalam Pengencer Tris Kuning Telur Selama Masa Preservasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Epididimis Mencit (*Mus musculus L.*))

Efie Fadrijah Eka Dewi^{*}, Mahriani

Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Jember, Jl. Kalimantan No.37, Jember, 68121, Indonesia

ABSTRACT

Spermatozoa preservation is a method used to store spermatozoa in a diluent solution such as NaCl or tris-egg yolk. However, the longer storage of spermatozoa in the diluent solution can generally form ROS (Reactive Oxygen Species). The addition of antioxidants such as vitamin C to the diluent is expected to be able to bind ROS so that they are not toxic to spermatozoa and sperm quality can be maintained during the preservation period. The purpose of this study was to determine the effect of giving the antioxidant vitamin C in tris-egg yolk diluent during the preservation period on the quality of mice epididymal spermatozoa. Vitamin C used in this study was 0.5 mg, 1 mg, and 2 mg in 100 ml of tris-egg yolk diluent. Observation of spermatozoa quality was carried out within 0 to 48 hours with a span of 12 hours. The results showed that the addition of Vitamin C concentrations of 0.5 mg, 1 mg, and 2 mg in 100 ml of tris-egg yolk diluent was able to maintain the percentage of motility and vitality, but the longer the storage the quality of spermatozoa decreased. The concentration of vitamin C 0.5 mg, 1 mg, and 2 mg in 100 ml of tris-egg yolk diluent is a good concentration to maintain the quality of spermatozoa during 12 hours of storage, the rest will decrease. Further research is needed to increase the storage time of spermatozoa by using vitamin C and tris-egg yolk.

Preservasi spermatozoa merupakan metode yang digunakan untuk menyimpan spermatozoa dalam suatu larutan pengencer seperti NaCl ataupun tris kuning telur. Namun penyimpanan spermatozoa yang semakin lama di dalam larutan pengencer umumnya bisa membentuk ROS (Reactive Oxygen Species). Penambahan zat antioksidan seperti vitamin C ke dalam larutan pengencer diharapkan mampu mengikat ROS sehingga tidak bersifat toxic terhadap spermatozoa dan kualitas sperma dapat dipertahankan selama masa preservasi. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dalam pengencer tris kuning telur selama masa preservasi terhadap kualitas spermatozoa epididimis mencit. Vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini 0.5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml larutan pengencer Tris Kuning Telur. Pengamatan kualitas spermatozoa dilakukan dalam waktu 0 hingga 48 jam dengan rentang waktu 12 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian Vitamin C konsentrasi 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml pengencer tris kuning telur mampu mempertahankan persentase motilitas dan daya hidup, tetapi semakin lama penyimpanan kualitas spermatozoa mengalami penurunan. Konsentrasi vitamin C 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml pengencer tris kuning telur merupakan konsentrasi yang baik untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan 12 jam, selebihnya akan mengalami penurunan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar meningkatkan waktu penyimpanan spermatozoa dengan menggunakan vitamin C dan tris kuning telur.

Keywords: Antioxidant, *Mus musculus L.*, Preservation, Spermatozoa.

^{*}Corresponding author:
Efie Fadrijah Eka Dewi
E-mail: efie.fmipa@unej.ac.id

PENDAHULUAN

Mencit merupakan jenis hewan uji coba yang banyak digunakan dalam penelitian maupun praktikum di laboratorium. Hal ini dikarenakan mencit memiliki kelebihan seperti siklus hidup relative

pendek, banyaknya jumlah anak per kelahiran, mudah ditangani, memiliki karakteristik reproduksinya yang mirip dengan hewan mamalia lainnya, serta struktur anatomi, fisiologi dan genetik yang mirip dengan manusia [1], [2]. Salah satu bagian mencit yang digunakan dalam penelitian maupun praktikum di

Laboratorium Zoologi FMIPA Universitas Jember adalah spermatozoa.

Spermatozoa mencit memiliki struktur yang sama dengan sperma hewan lainnya yaitu terdiri atas 2 bagian utama kepala dan ekor yang dilindungi oleh membrane plasma. Salah satu spermatozoa yang digunakan dalam kegiatan praktikum preservasi spermatozoa adalah yang dikoleksi dari kauda epididimis mencit (*Mus musculus* L.). Spermatozoa yang terdapat di dalam kauda epididimis telah mampu bergerak atau motil serta mampu membuahi oosit. Hal ini terjadi karena spermatozoa yang terdapat di bagian kauda epididimis telah mengalami proses pematangan di bagian kaput dan korpus [3].

Proses preservasi spermatozoa epididymis mencit yang dilakukan selama ini menggunakan larutan pengencer berupa NaCl dengan konsentrasi tertentu dan disimpan pada suhu dingin. Namun penggunaan NaCl 0.9% sebagai larutan pengencer memiliki kelemahan yaitu tidak bisa digunakan untuk preservasi spermatozoa dalam waktu lama dan kurang mengandung sumber energi. Menurut Nilna [4], NaCl memberikan sifat buffer, mempertahankan pH semen, bersifat isotonis dengan cairan sel, melindungi spermatozoa terhadap coldshock dan penyeimbangan elektron yang sesuai, tetapi penyimpanan semen dengan larutan NaCl sebagai garam fisiologis hanya bisa digunakan tidak lebih dari 60 menit setelah penampungan. Hal ini dikarenakan NaCl kurang mengandung sumber energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa. Perlu tambahan bahan lain yang dapat memberikan energi atau nutritif sehingga menambah atau memperpanjang waktu spermatozoa untuk bertahan hidup dan mempertahankan pergerakan spermatozoa dalam media penyimpanan [5].

Menurut Prasetyaningtyas [6], plasma semen secara biokimiawi mengandung larutan penyanggah (buffer) sitrat, fruktosa serta lipid yang berfungsi menjaga integritas spermatozoa. Sehingga untuk mempertahankan kualitas spermatozoa asal kauda epididimis diperlukan pengenceran yang mampu menjaga kualitas selama penyimpanan pada suhu rendah. Pengenceran harus memiliki komposisi yang mirip dengan plasma semen secara alami sehingga dapat memenuhi kebutuhan dan mampu mempertahankan fungsi fisiologis spermatozoa.

Jenis pengencer yang lain yang bisa digunakan adalah pengencer Tris kuning telur. Penelitian D. Hartanti, dkk [7] membuktikan bahwa pengencer

sitrat kuning telur dan tris kuning telur mempunyai pengaruh yang sama terhadap kemampuan daya hidup spermatozoa pada berbagai interval pengamatan setelah pengenceran. Tris merupakan larutan yang mengandung asam sitrat dan fruktosa yang berperan sebagai penyangga (buffer), untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa serta mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, sumber energi dan melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*). Penyimpanan spermatozoa yang semakin lama di dalam larutan pengencer umumnya bisa membentuk ROS (*Reactive Oxygen Species*), dengan menambahkan zat antioksidan ke dalam larutan pengencer harapannya adalah dapat mengikat ROS sehingga tidak bersifat toxic terhadap spermatozoa dan kualitas sperma dapat dipertahankan selama masa preservasi. Menurut Wibisono [8], vitamin C merupakan salah satu antioksidan dan non enzimatis yang mempunyai sifat polaritas yang tinggi karena banyak mengandung gugus hidroksil sehingga mudah larut dalam air. Karena itu, vitamin ini terdapat di cairan extra seluler. Hal ini memberikan keuntungan karena mudah diubah oleh tubuh. Vitamin C dapat bereaksi dan mampu menetralkan radikal bebas. Oleh sebab itu tujuan dari penelitian ini yaitu ingin mengetahui pengaruh pemberian antioksidan vitamin C dalam pengencer tris kuning telur selama masa preservasi terhadap kualitas spermatozoa epididimis mencit.

METODE

Penambahan Antioksidan Vitamin C dalam Pengencer Tris Kuning Telur

Dosis vitamin C yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada Pahlevy *et al.*, [9] yang telah dimodifikasi yaitu 0.5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml larutan pengencer Tris Kuning Telur. Larutan pengencer Tris Kuning Telur terdiri atas 80% tris dasar (Tris (Hidroksimetil) Aminometan, Asam Sitran, Fructosa, Aquades), 20% kuning telur, 0.001 g/ml penicillin dan 0.001 g/ml streptomycin. Larutan pengencer Tris Kuning Telur yang sudah ditambahkan vitamin C disimpan dalam suhu ruang.

Sampling spermatozoa

Sampling spermatozoa mencit (*M. musculus* L.) dilakukan melalui metode maserasi dengan lima kali

pengulangan mencit (*M. musculus* L.). Mencit yang digunakan dibedah kemudian dipotong bagian kauda epididimis masing-masing testis. Kedua bagian kauda epididimis tersebut dicuci menggunakan NaCl 0,9%. Setelah itu, dilakukan pencacahan pada kedua kauda epididimis masing-masing menggunakan 1000 µl NaCl 0,9% kemudian dimasukkan ke dalam empat macam pengencer sesuai dengan kelompok perlakuan [10].

Pengamatan Kualitas Spermatozoa Sebelum pengenceran

Pengamatan kualitas spermatozoa yang dilakukan sebelum pengenceran meliputi persentase motilitas spermatozoa, persentase viabilitas spermatozoa, persentase abnormalitas dan konsentrasi spermatozoa. Metode pengujian terhadap kualitas spermatozoa yang dilakukan adalah sebagai berikut:

a. Persentase Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa diamati dengan melihat persentase motil progresif yaitu spermatozoa yang bergerak lurus kedepan [11]. Motilitas spermatozoa dievaluasi dengan cara mengambil 10 µl suspensi spermatozoa, diletakkan diatas gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x [12]. Pengamatan dilakukan terhadap 100 spermatozoa dan kategori spermatozoa yang diamati adalah sebagai berikut:

- Kategori 0 : spermatozoa tidak bergerak sama sekali
- Kategori 1 : spermatozoa bergerak lambat
- Kategori 2 : spermatozoa bergerak ke depan dengan kecepatan sedang atau berputar-putar
- Kategori 3 : spermatozoa bergerak lurus ke depan

Persentase jumlah spermatozoa yang motil ditentukan dengan menjumlahkan kategori 2 dan 3, dibagi 100 kemudian dikalikan 100%. Angka 100 merupakan jumlah kategori 0, 1, 2 dan 3 [13].

b. Persentase Daya Hidup Spermatozoa

Persentase daya hidup spermatozoa dilakukan melalui teknik pewarnaan eosin 1% dalam alkohol. Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala tidak berwarna atau transparan sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak 200 spermatozoa diamati dengan mikroskop cahaya menggunakan perbesaran 400x [14].

Prosedur pengamatan dilakukan dengan mengambil $\pm 10 \mu\text{l}$ spermatozoa, diletakkan pada

obyek glass kemudian ditambah dengan pewarna eosin dan dicampurkan. Preparat dibuat dengan cara menekan dan mendorong menggunakan *cover glass* membentuk sudut 45° dan didorong sepanjang preparat untuk mendapatkan lapisan yang setipis mungkin [15]. Rumus perhitungan persentase hidup spermatozoa menurut Hidayaturrahmah [16] adalah sebagai berikut:

$$\text{Persentase hidup sperma (\%)} = \frac{\Sigma \text{ sperma hidup}}{\Sigma \text{ total sperma}} \times 100\% \dots (1)$$

c. Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Perhitungan persentase spermatozoa abnormal dilakukan dengan menggunakan preparat yang digunakan untuk mengevaluasi persentase daya hidup spermatozoa. Evaluasi dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang normal dan abnormal. [17].

Abnormalitas diamati pada bagian kepala dan ekor melalui perhitungan sebanyak 200 spermatozoa. Pengamatan abnormalitas dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Menurut Arifianti *et al.*, [18] persentase spermatozoa abnormal dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah spermatozoa normal} = \frac{\Sigma \text{ sel spermatozoa abnormal}}{\Sigma \text{ total sel spermatozoa}} \times 100\% \dots (2)$$

d. Konsentrasi Spermatozoa

Perhitungan konsentrasi spermatozoa dilakukan menggunakan haemocytometer yang bertujuan untuk mengetahui jumlah spermatozoa/ml. Perhitungan spermatozoa yang terdapat pada 5 kotak yaitu 4 kotak di sudut dan 1 kotak ditengah dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 x. Jika jumlah spermatozoa dalam 5 kotak adalah X dan rata-rata adalah Y, maka konsentrasi dalam cairan tersebut adalah $Y \times 10^6$ sel/ml. [19].

Pengenceran dan Pengawetan Spermatozoa

Spermatozoa diencerkan menggunakan larutan pengencer Tris kuning telur yang telah ditambahkan vitamin C masing-masing dosis perlakuan. Perbandingan spermatozoa dengan larutan pengencer yaitu 1:1. Spermatozoa yang telah diencerkan kemudian disimpan pada suhu 5°C selama waktu yang ditentukan [10].

Pengamatan Kualitas Spermatozoa setelah pengenceran

Pengamatan kualitas spermatozoa setelah pengenceran meliputi persentase motilitas spermatozoa, persentase viabilitas spermatozoa dan persentase abnormalitas selama 5 waktu penyimpanan.

Waktu penyimpanan yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada Rahardianto *et al.*, [15] yaitu 0 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam.

Parameter Uji

Parameter yang menjadi indikator spermatozoa memiliki kualitas baik untuk dilakukan preservasi adalah kualitas spermatozoa dengan persentase motilitas dan daya hidup >70% [20], serta persentase abnormalitas adalah < 30% [21].

Analisis Data

Persentase kualitas spermatozoa dengan penambahan beberapa dosis vitamin C dalam pengencer Tris kuning telur dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) dengan tingkat akurasi 95%. Apabila terdapat perbedaan pada masing-masing perlakuan, maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Duncan* untuk mengetahui signifikansi konsentrasi Vitamin C antar kelompok perlakuan pada setiap parameter uji. Analisis statistik dilakukan menggunakan SPSS *Window Version 15.0*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Kualitas Spermatozoa Sebelum Proses Pengenceran

Sebelum dilakukan preservasi dan pengenceran dilakukan evaluasi terlebih dahulu terhadap spermatozoa mencit (*M. musculus* L.) untuk menentukan kualitas spermatozoanya. Evaluasi yang dilakukan meliputi persentase motilitas, persentase daya hidup, persentase abnormalitas dan konsentrasi spermatozoa. Hasil pengamatan kualitas spermatozoa kauda epididimis sebelum pengenceran dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas spermatozoa kauda epididimis mencit (*Mus musculus* L.) sebelum pengenceran

Kualitas Spermatozoa	Rata-rata ± SD
Motilitas (%)	71,60 C 7,47
Daya Hidup (%)	71,50 ± 12,94
Abnormalitas (%)	17,70 ± 6,76
Konsentrasi (per ml)	51,7 x 10 ⁶ ± 32,10

Berdasarkan data kualitas spermatozoa kauda epididimis pada Tabel 1 di atas, dapat diketahui bahwa spermatozoa mencit (*M. musculus* L.) yang akan digunakan penelitian memiliki kualitas yang baik dan memenuhi syarat untuk dilakukan preservasi. Hal ini

sesuai dengan indikator spermatozoa yang baik yaitu persentase motilitas dan daya hidup adalah > 70% [20], persentase abnormalitas adalah < 30% [21] serta konsentrasi spermatozoa kauda epididimis pada hewan mamalia berkisar 10-50 juta sel/ml [14].

Pengamatan Kualitas Spermatozoa Setelah Proses Pengenceran

Selama masa preservasi, evaluasi terhadap kualitas spermatozoa setelah proses pengenceran meliputi persentase motilitas, persentase daya hidup dan persentase abnormalitas yang dilakukan pada waktu 0 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam. Hasil pengamatan kualitas spermatozoa kauda epididimis yang dipreservasi hingga 48 jam penyimpanan dapat dilihat pada Tabel 2.

Pengaruh Konsentrasi Vitamin C Terhadap Kualitas Spermatozoa

Pengaruh konsentrasi vitamin C terhadap kualitas spermatozoa mencit meliputi motilitas, daya hidup dan abnormalitas dapat dilihat berdasarkan nilai persentase yang didapatkan pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan bahwa rerata persentase motilitas spermatozoa semakin meningkat seiring meningkatnya konsentrasi vitamin C yang digunakan pada lama penyimpanan 12 dan 24 jam dengan nilai rerata persentase tertinggi pada konsentrasi 2 mg yaitu 79,00% (penyimpanan 0 Jam) dan 44,40% (penyimpanan 48 jam). Begitu pula untuk rerata persentase daya hidup spermatozoa juga meningkat seiring meningkatnya konsentrasi vitamin C pada lama penyimpanan 12 dan 24 jam. Nilai rerata persentase daya hidup spermatozoa paling tinggi untuk penyimpanan 0 - 36 jam yaitu pada konsentrasi 2 mg dengan nilai berturut-turut 80,20%; 79,40%, 75,60% dan 67,80%. Sedangkan pada penyimpanan 48 jam nilai rerata persentase daya hidup spermatozoa tertinggi pada konsentrasi vitamin C 0,5 mg yaitu 54,40%. Nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa dapat menurun seiring meningkatnya konsentrasi vitamin C yang digunakan hanya pada penyimpanan 0 dan 48 jam, dengan nilai terkecil yaitu pada konsentrasi 2 mg berturut-turut sebesar 12,00% dan 13,20%. Namun secara keseluruhan nilai rerata persentase abnormalitas spermatozoa paling kecil yaitu pada perlakuan kontrol penyimpanan 24 jam yaitu 7,80%.

Tabel 2. Persentase motilitas, daya hidup dan abnormalitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) selama penyimpanan 0 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam

Lama Penyimpanan (Jam)	Dosis Vitamin C (mg)	Variabel Kualitas Spermatozoa		
		Motilitas (%)	Daya Hidup (%)	Abnormalitas (%)
0	0	72,20 ± 8,78 ^b	69,90 ± 6,77 ^b	18,00 ± 8,63 ^b
	0,5	71,60 ± 5,68 ^a	72,60 ± 1,64 ^a	15,40 ± 7,70 ^b
	1	72,20 ± 8,70 ^a	72,00 ± 1,18 ^a	11,20 ± 3,89 ^b
	2	79,00 ± 7,77 ^a	80,20 ± 9,28 ^a	12,00 ± 5,70 ^b
12	0	69,69 ± 4,39 ^b	72,80 ± 8,78 ^b	10,80 ± 8,93 ^b
	0,5	70,60 ± 4,33 ^a	71,40 ± 1,86 ^a	18,60 ± 7,64 ^a
	1	72,00 ± 6,82 ^a	73,60 ± 1,35 ^a	23,00 ± 1,43 ^b
	2	74,40 ± 3,97 ^a	79,40 ± 9,86 ^a	18,60 ± 7,30 ^b
24	0	56,40 ± 8,90 ^a	43,00 ± 5,15 ^a	7,80 ± 2,59 ^b
	0,5	62,00 ± 5,96 ^a	69,00 ± 1,62 ^a	14,00 ± 8,94 ^a
	1	63,60 ± 0,99 ^a	52,80 ± 1,27 ^b	14,00 ± 8,94 ^b
	2	67,00 ± 2,12 ^a	75,60 ± 1,00 ^a	10,20 ± 4,55 ^a
36	0	45,80 ± 8,22 ^a	33,70 ± 2,44 ^a	16,00 ± 8,75 ^b
	0,5	52,80 ± 3,03 ^a	66,90 ± 1,58 ^a	14,40 ± 2,41 ^b
	1	46,60 ± 6,35 ^a	45,20 ± 1,48 ^b	16,80 ± 9,63 ^b
	2	52,80 ± 9,04 ^a	67,80 ± 1,29 ^a	12,20 ± 4,55 ^b
48	0	41,60 ± 5,64 ^a	18,60 ± 8,90 ^a	20,00 ± 9,98 ^b
	0,5	43,40 ± 2,97 ^a	54,40 ± 1,14 ^a	20,80 ± 7,26 ^b
	1	40,49 ± 1,00 ^a	12,20 ± 3,86 ^a	19,00 ± 6,63 ^a
	2	44,40 ± 1,04 ^a	44,40 ± 1,73 ^a	13,20 ± 6,32 ^b

Superskrip (^{a,b}) yang berbeda dalam kolom yang sama pada masing-masing variable kualitas spermatozoa menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).

Pengambilan sampel spermatozoa kauda epididimis dari mencit (*Mus musculus* L.) dilakukan dengan melalui teknik maserasi. Spermatozoa yang telah diambil, diberikan perlakuan larutan pengencer tris kuning telur yang telah ditambah vitamin C berbagai dosis kemudian segera disimpan pada suhu 5°C. Sisa dari spermatozoa yang tidak disimpan digunakan sebagai evaluasi awal sebelum pengenceran guna mengetahui kualitas spermatozoa berdasarkan standar preservasi. Spermatozoa yang berasal dari epididimis ini hanya mengandung sedikit plasma semen, sedangkan spermatozoa yang diencerkan dalam pengencer tris kuning telur tanpa atau dengan penambahan vitamin C dan telah mengalami masa penyimpanan selama beberapa jam diduga telah memanfaatkan kandungan pengencer tris kuning telur. Tris aminomethan mempunyai kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah. Sementara itu, khasiat kuning telur terletak pada lipoprotein dan lecithin yang terkandung didalamnya, yang berfungsi untuk mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa [22]. Spermatozoa yang diencerkan dalam pengencer tris kuning telur dengan penambahan vitamin C yang telah mengalami masa

penyimpanan selama beberapa jam diduga telah memanfaatkan kandungan pengencer serta tambahan antioksidan yang berasal dari vitamin C untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hal ini dapat dilihat pada perlakuan penambahan 1 mg dan 2 mg vitamin C dalam 100 ml pengencer tris kuning telur pada waktu penyimpanan 0 jam dan 12 jam menunjukkan rerata persentase motilitas dan persentase daya hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan rerata persentase keduanya pada evaluasi sebelum pengenceran (Tabel 1 dan 2).

Hasil analisis data menggunakan uji statistic ANOVA ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($P = 0,309$) $> 0,05$ pada perlakuan pemberian berbagai dosis vitamin C terhadap abnormalitas spermatozoa. Namun, pada parameter motilitas dan daya hidup spermatozoa memiliki nilai yang signifikan dengan nilai P berturut-turut adalah ($P = 0.017$) $> 0,05$ dan ($P = 0.000$) $> 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin C berbagai dosis dalam larutan pengencer tris kuning telur berpengaruh secara signifikan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa.

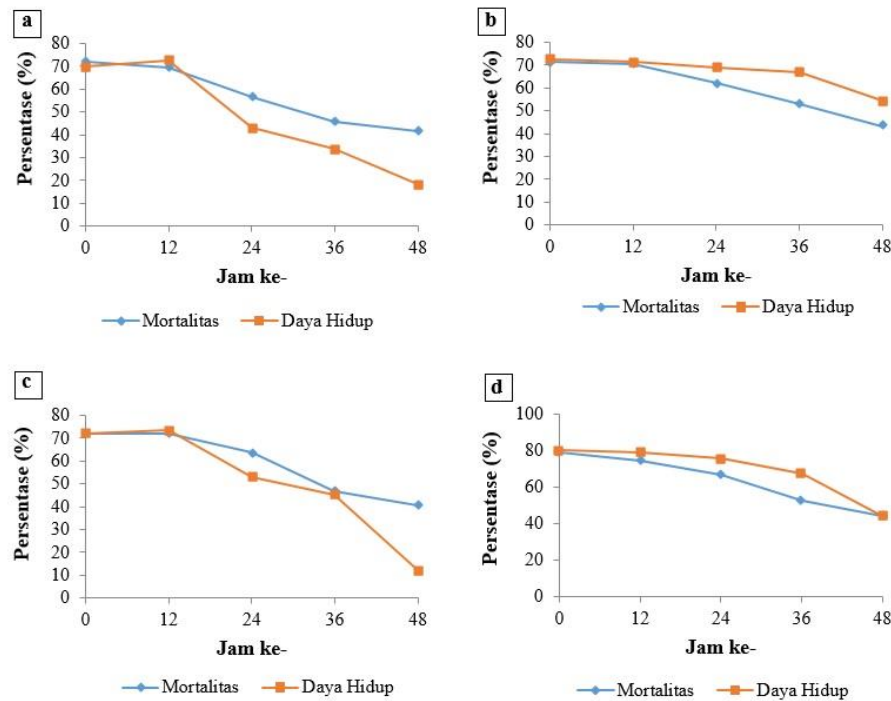
Hasil uji lanjut Duncan pada parameter motilitas dan daya hidup spermatozoa mencit menunjukkan

bahwa dosis vitamin C 0 mg tidak berbeda nyata dengan dosis vitamin C 1 mg, namun berbeda nyata dengan dosis vitamin C 0,5 mg dan 2 mg. Hasil ini membuktikan bahwa penambahan vitamin C dalam pengencer tris kuning telur berpengaruh terhadap persentase motilitas dan daya hidup spermatozoa setelah penyimpanan pada suhu 5°C. Pemberian vitamin C pada penelitian ini sebagai antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas. Vitamin C atau asam askorbat merupakan senyawa kimia yang larut dalam air [23]. Radikal bebas dapat dikendalikan dan dicegah oleh antioksidan. Salah satu antioksidan yang efektif dalam mengatasi radikal bebas adalah vitamin C. Vitamin C merupakan antioksidan yang dapat menetralkan hidroksil, superoksida, dan radikal hidrogen dan radikal peroksida [24]. Vitamin C atau asam askorbat non enzimatis pada cairan seminal akan melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif. Defisiensi vitamin C akan mempengaruhi kualitas spermatozoa, baik jumlah, morfologi maupun motilitasnya [25].

Pengaruh Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Spermatozoa

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol nilai persentase mortalitas spermatozoa menurun seiring lama waktu

penyimpanan. Nilai persentase daya hidup spermatozoa meningkat pada waktu penyimpanan 12 jam sebesar 2,9% dari waktu penyimpanan 0 jam, setelah itu mengalami penurunan hingga waktu penyimpanan 48 jam. Namun secara keseluruhan nilai persentase mortalitas spermatozoa pada perlakuan kontrol lebih tinggi dari pada nilai persentase daya hidup spermatozoa (Gambar 1a.). Pada perlakuan dosis vitamin C 0,5 mg dan 2 mg, semakin lama waktu penyimpanan, nilai persentase mortalitas dan daya hidup spermatozoa juga menurun dengan nilai persentase daya hidup spermatozoa lebih tinggi dibandingkan dengan nilai persentase mortalitas spermatozoa disetiap waktu penyimpanan (Gambar 1b dan 1d). Namun hal ini berbeda pada dosis vitamin C 1 mg. Nilai persentase mortalitas spermatozoa pada kelompok perlakuan dosis vitamin C 1 mg mengalami penurunan seiring waktu penyimpanan semakin lama. Nilai persentase daya hidup spermatozoa pada kelompok perlakuan dosis vitamin C 1 mg meningkat pada waktu penyimpanan 12 jam sebesar 1,6% dari waktu penyimpanan 0 jam, setelah itu mengalami penurunan hingga waktu penyimpanan 48 jam, dengan nilai penurunan tertinggi terjadi pada waktu penyimpanan 48 jam yaitu 33% dari waktu penyimpanan 36 jam (Gambar 1c).



Gambar 1. Grafik pengaruh lama waktu penyimpanan terhadap mortalitas dan daya hidup spermatozoa, a. kelompok kontrol, b. kelompok perlakuan dosis Vitamin C 0,5 mg, c. kelompok perlakuan dosis Vitamin C 1 mg, d. kelompok perlakuan dosis Vitamin C 2 mg

Hasil analisis data menggunakan uji statistic ANOVA ($\alpha = 5\%$) menunjukkan bahwa lama penyimpanan spermatozoa dalam pengencer tris kuning telur berpengaruh signifikan terhadap abnormalitas spermatozoa ($P = 0,048$) $< 0,05$; mortalitas spermatozoa ($P = 0,000$) $< 0,05$ dan daya hidup spermatozoa ($P = 0,000$) $< 0,05$. Hasil uji lanjut *Duncan* pada parameter abnormalitas spermatozoa menunjukkan bahwa lama penyimpanan 0 jam tidak berbeda nyata dengan lama penyimpanan 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam tetapi lama penyimpanan 24 jam berbeda nyata dengan penyimpanan 12 jam dan 48 jam. Hasil uji lanjut pada parameter mortalitas spermatozoa menunjukkan bahwa lama penyimpanan 0 jam tidak berbeda nyata dengan lama penyimpanan 12 jam, tetapi berbeda nyata dengan lama penyimpanan 24 jam, 36 jam dan 48 jam.

Hasil uji lanjut *Duncan* pada parameter daya hidup spermatozoa menunjukkan bahwa lama penyimpanan 0 jam tidak berbeda nyata dengan lama penyimpanan 12 jam, namun berbeda nyata dengan lama penyimpanan 24, 36 dan 48 jam. Lama penyimpanan 12 jam tidak berbeda nyata dengan lama penyimpanan 0 jam, namun berbeda nyata dengan 24, 36 dan 48 jam. Lama penyimpanan 24 jam tidak berbeda nyata dengan 36 jam, namun berbeda nyata dengan 0, 12, dan 48 jam, begitu pula untuk hasil uji lanjut lama penyimpanan 36 jam. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa lama penyimpanan 48 jam berbeda nyata pada lama penyimpanan 0, 12, 24 dan 36 jam.

Suhu penyimpanan merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap kualitas sperma. Untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan pada suhu tertentu terhadap kualitas sperma dapat diketahui dari motilitas, mortalitas dan abnormalitas sperma setelah disimpan dalam suhu 5°C . Motilitas menurun seiring dengan lamanya penyimpanan. Menurunnya daya gerak atau motilitas ini dikarenakan spermatozoa setelah dikeluarkan masih melakukan aktivitas pergerakan dan metabolisme. Aktivitas pergerakan/motilitas ini sangat dipengaruhi oleh temperatur sekitarnya [26]. Semakin tinggi temperatur penyimpanan maka akan semakin tinggi pula aktivitas pergerakan spermatozoa. Pergerakan ini memerlukan energi sedangkan pembentukan energi yang diproduksi oleh spermatozoa di luar tubuhnya sangat terbatas. Selain itu hasil metabolisme menghasilkan hasil sampingan yaitu berupa asam laktat yang dapat menyebabkan perubahan pH pada medium sekitarnya

[27], [28]. Angka pH ini akan mempengaruhi daya hidup/pergerakan spermatozoa. Menurut Siudzinska dan Lukaszewicz [28], semakin lama penyimpanan akan semakin banyak spermatozoa yang mati yang akan merubah pH menjadi semakin asam dan akibatnya akan mematikan spermatozoa lainnya.

Pemberian Vitamin C konsentrasi 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml pengencer tris kuning telur mampu mempertahankan persentase motilitas dan daya hidup, tetapi semakin lama penyimpanan kualitas spermatozoa mengalami penurunan. Konsentrasi vitamin C 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml pengencer tris kuning telur merupakan konsentrasi yang baik untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan 12 jam, selebihnya akan mengalami penurunan.

KESIMPULAN

Pemberian Vitamin C konsentrasi 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml pengencer tris kuning telur mampu mempertahankan persentase motilitas dan daya hidup, tetapi semakin lama penyimpanan kualitas spermatozoa mengalami penurunan. Konsentrasi vitamin C 0,5 mg, 1 mg dan 2 mg dalam 100 ml pengencer tris kuning telur merupakan konsentrasi yang baik untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan 12 jam, selebihnya akan mengalami penurunan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut agar meningkatkan waktu penyimpanan spermatozoa dengan menggunakan vitamin C dan tris kuning telur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIPA Universitas Jember tahun anggaran 2018 yang telah memberikan dukungan finansial penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] K. Herrmann, F. Pistollato, and M. Stephens, "Beyond the 3Rs: expanding the use of humanrelevant replacement methods in biomedical research," *ALTEX*, vol. 36, no. 3, pp. 343-352, 2019.
- [2] L. Fianti, "Efektivitas perasan daun afrika (*Vernonia amygdalina* Del) terhadap penurunan kadar glukosa darah mencit (*Mus musculus*)," Universitas Pasundan, 2017.

- [3] D. Nuraisyah, "Motilitas spermatozoa asal epididimis monyet ekor panjang (*Macaca fascicularis*) dalam pengencer tris kuning telur & midified human turbal fluid," Institut Pertanian Bogor, 2002.
- [4] Nilna, *Standar operasional Pekerjaan Prosesing Semen*. Sumatera Barat: Dinas Peternakan, 2010.
- [5] N. Isnaini, and Suyadi, "Semen ayam kedu pada suhu kamar dalam pengencer Larutan NaCl Fisiologi & Ringer's," *J. Ternak Trop.*, vol. 1, no. 2, pp. 55–56, 2000.
- [6] W. E. Prasetyaningtyas, M. Agus, S. Mokhamad, F. K. Hewan, dan I. P. Bogor, "Karakteristik dan komposisi semen kancil (*Tragulus javanicus*) yang dikoleksi dengan elektroejakulator," *J. Anat. Indones.*, vol. 1, no. 1, pp. 30-37, 2012.
- [7] D. Hartanti, E. T. Setiatin, and Sutopo, "Perbandingan penggunaan pengencer semen sirat kuning telur dan tris kuning telur terhadap persentase daya hidup spermatozoa sapi jawa brebes," *Anim. Agric. J.*, vol. 1, no. 1, pp. 33-42, 2012.
- [8] M. Wibisono, "Pengaruh vitamin c terhadap jumlah spermatid pada mus musculus yang dipapar gelombang ultrasonik," *J. Kedokt. Yars.*, vol. 9, no. 1, pp. 96-103, 2001.
- [9] J. R. Pahlevy, H. Ratnani, T. I. Restiadi, F. Fikri, A. L. Saputro, and B. Agustono, "The addition of vitamin C in tris-egg yolk extender maintained Sapera goat semen quality in 5° C storage," *Ovozoa J. Anim. Reprod.*, vol. 11, no. 1, pp. 1-8, 2022.
- [10] T. Nugraheni, O. P. Astirin, and T. Widiyani, "Pengaruh vitamin C terhadap perbaikan spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) setelah pemberian ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)," *Biofarmasi*, vol. 1, no. 1, pp. 1693-2242, 2003.
- [11] C. Nazlie, S. Iman, A. Srihardi, and B. Arief, "Konsentrasi dan kualitas spermatozoa kucing domestik (*Felis catus*) yang diambil dari epididimis dan ductus deferens setelah preservasi pada suhu 4°C," *Biota*, vol. XI, no. 1, pp. 34-39, 2006.
- [12] W. M. M. Nalley, R. Handarini, T. L. Yusuf, B. Purwantara, and G. Semiadi, "The Effect of glycerol concentration in tris glucose egg yolk extender on the quality of timor deer frozen semen," *J. Indones. Trop. Anim. Agric.*, vol. 36, no. 2, 2011.
- [13] Nafa and Eshre-Siga, *Manual on Basic Semen Analysis*. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- [14] M. Rizal, M. Riyadhi, B. Irawan, A. Wahdi, Habibah, and Herdis, "Daya hidup spermatozoa epididimis sapi persilangan yang dipreservasi dengan air kelapa muda pada suhu 5°C," vol. 18, no. 36, pp. 571-579, 2017.
- [15] A. Rahardhianto, N. Abdulgani, N. Trisyani, J. Biologi, F. Matematika, and P. Alam, "Pengaruh konsentrasi larutan madu dalam NaCl fisiologis terhadap viabilitas dan motilitas masa penyimpanan," *J. Sains & Seni*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [16] Hidayaturrahmah, "Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa," *Bioscientiae*, vol. 4, no.1, pp. 9-18, 2007.
- [17] M. Surachman, M. Rizal, and H. Maheshwari, "Kualitas semen cair asal epididimis kerbau belang dalam bahan pengencer andromed yang mendapat penambahan sukrosa," *Media Peternakan*, vol. 32, no. 2, pp. 88-94, 2009.
- [18] R. I. Arifiantini and F. Ferdian, "Tinjauan aspek morfologi dan morfometri spermatozoa kerbau rawa (*Bubalus Bubalis*) yang dikoleksi dengan Teknik Masase," *Scientific Repository*, 2006.
- [19] H. S. Condro, A. S. Mubarak, and L. Sulmartiwi, "Pengaruh penambahan madu pada media pengencer nacl fisiologis dalam proses penyimpanan sperma terhadap kualitas sperma ikan komet (*Carassius auratus auratus*)," *Media Journal of Marine and Coastal Science*, vol. 1, no. 1, pp. 1-12, 2012.
- [20] J. A. Delgadillo, B. Leboeuf, P. Chemineau, and L. N. R. A. R. Physiology, "Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks," *Small Ruminant Research*, vol. 9, no. 1, pp. 47-59, 1992.
- [21] R. Menkveld, C. A. G. Holleboom, and J. P. T. Rhemrev, "Measurement and significance of sperm morphology," *Asian J. Androl.*, vol. 13, no. 1, pp. 59-68, 2011.
- [22] R. I. Arifiantini and T. Yusuf, "Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi," *Majalah Ilmiah Peternakan*, vol. 9, no.3, pp. 1-11, 2006.
- [23] M. Aina and D. Suprayogi, "Uji kualitatif vitamin c pada berbagai makanan dan pengaruhnya terhadap pemanasan," *Sainmatika*, pp. 61-67, 2014.
- [24] J. H. Siregar, "Pengaruh pemberian vitamin c terhadap jumlah sel leydig dan jumlah sperma mencit jantan dewasa (*Mus musculus* L.) yang dipapari Monosodium Glutamate (MSG)," Universitas Sumatera Utara, 2009.
- [25] A. H. Colagar and E. T. Marzony, "for Acid Ascorbic Seminal Plasma : Determination and Its Relationship to Sperm Quality," no. September, pp. 144-149, 2009.
- [26] P. R. Dumpala, H. M. Parker, dan C. D. McDaniel, "The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen," *Int. J. Poult. Sci.*, vol. 5, no. 9, pp. 838-845, 2006.
- [27] A. Latif, A. Ijaz, M. Aleem, and A. Mahmud, "Effect of osmotic pressure and ph on the short-term storage

and fertility of broiler breeder sperm,” *Pakistan Veterinary*, vol. 25, no. 4, pp. 4-7, 2005.

- [28] A. Siudzinska and E. Łukaszewicz, “Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds,” *Journal of Applied Poultry Research*, vol. 17, no 1, pp. 101-108, 2008.