

Pengaruh Penambahan Vitamin E pada Beberapa Pengencer terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ayam Kedu Merah

Sri Lestari^{1*}, Dadang Mulyadi Saleh³, Ismoyowati², Mas Yedi Sumaryadi³ dan Elly Tugiyanti²

¹Mahasiswa Magister Fakultas Peternakan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

²Dosen Bidang Produksi Ternak Unggas, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

³Dosen Bidang Fisiologi dan Reproduksi Ternak, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

*Corresponding author email: ismoyowati@unsoed.ac.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah mengetahui interaksi vitamin, jenis pengencer dan lama penyimpanan dalam semen ayam kedu merah serta pengaruh faktor terhadap kualitas mikroskopis. Rancangan Acak Kelompok (RAK) faktorial (2x4x4) faktor pertama jenis pengencer (P) : ringer laktat (P₁) dan susu skim + 50 mM glukosa (P₂), faktor kedua vitamin E (V₀₋₃) : 0%, 1%, 2% dan 3%, faktor ketiga lama penyimpanan (W₀₋₃) : 0, 2, 4 dan 6 jam. Semen dari sepuluh ekor ayam kedu merah diencerkan sesuai perlakuan lalu disimpan pada suhu 4°C selama 0, 2, 4 dan 6 jam kemudian dilakukan pengamatan motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Hasil analisis variansi menunjukkan tidak terdapat interaksi antara jenis pengencer, vitamin E dan lama penyimpanan (P>0,05) terhadap motilitas dan viabilitas, namun terdapat interaksi sangat nyata antara jenis pengencer dengan vitamin (P<0.01) terhadap viabilitas. Hasil uji orthogonal polinomial menunjukkan pengaruh sangat nyata secara kubik (P<0,01) hasil terbaik P₂V₂ = 93.53% Perlakuan jenis pengencer berbeda nyata (P<0.05) terhadap motilitas dengan hasil terbaik P₁ = 81.71 ± 2.29 dan terdapat perbedaan sangat nyata (P<0.01) terhadap viabilitas, hasil terbaik P₁ = 92.12±1.74. Penambahan vitamin tidak berbeda nyata (P>0.05) terhadap motilitas dan viabilitas. Lama penyimpanan berbeda sangat nyata (P<0.01) terhadap dua variabel, hasil terbaik pada W₂. Dapat disimpulkan penambahan vitamin E dalam pengencer ringer laktat lebih baik dari susu skim dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas selama penyimpanan 4 jam.

Kata Kunci : Ayam kedu merah, vitamin E, ringer laktat dan susu skim dan kualitas spermatozoa

ABSTRACT

The purpose of this research was to investigate the influence of vitamin, diluent type, and length of storage into red kedu chicken semen and the influence factor on the quality of microscopics. Group Randomized Design (GRD) 2x4x4 factorial. The first factor of the type of diluent (p) = lactate ringer (p₁) and skim milk + 50 mM glucose (p₂). The second factor of vitamin E (v₀₋₃) = 0%, 1%, 2%, and 3%. Third factor of storage length (w₀₋₃) = 0, 2, 4 and 6 hours. Semen was diluted with each treatment factors was stored at 4°C for 0, 2, 4 dan 6 hours and then was observed for the motility, viability and abnormality. The results showed that vitamins, diluent type and length of storage variants had no significant interaction (P>0.05) on motility and viability but had significant interaction between diluent type with the addition of vitamins (P<0.01) on viability p₂v₂ = 93.53%. The diluent type variant had significant interaction (P<0.05) on motility p₁ = 81.71±2.29 and had significant interaction (P<0.01) on viability P₁ = 92.12±1.74. The addition of vitamins no significantly affected (P>0.05) on motility and viability. The length of storage had significant (P<0.01) on motility and viability by w₂. It can be concluded that the addition of vitamin in ringer lactate diluents is better than skim milk in maintaining motility and viability in 4-hour storage.

Keywords: Red kedu chicken, vitamin E, lactate ringer, skim milk and sperm quality

PENDAHULUAN

.Ayam lokal yang banyak dibudidayakan oleh sebagian besar masyarakat pedesaan adalah Ayam Kedu Merah, merupakan rumpun

yang dikembangkan di wilayah Jawa Tengah, khususnya di daerah Temanggung. Kelebihan yang dimiliki ayam kedu jengger merah antara lain daya tahan tubuh relatif tinggi, adaptasi terhadap lingkungan, serta produksi telur yang

tinggi dibandingkan ayam lokal lainnya (Suryani *et al.* 2012). Salah satu masalah yang dialami peternakan ayam lokal Indonesia adalah belum tersedianya bibit ayam unggul, yang terjamin kualitasnya serta perkembangan populasi yang masih rendah.

Peningkatan mutu genetik ternak akan cepat dilakukan dengan cara IB (inseminasi buatan), karena pada IB hanya pejantan yang mempunyai genetik unggul dan teruji yang dipakai untuk mengawini ternak betina sehingga akan menghasilkan mutu genetik yang unggul pada keturunannya. Teknologi ini memerlukan bahan pengencer untuk proses pengenceran semen hal ini dikarenakan masalah semen segar pada unggas yang mana saat penyimpanan akan mengalami kerusakan secara perlahan akibat penguapan air dari plasma semen yang mengakibatkan spermatozoa mati, sehingga membutuhkan zat gizi baik dan lingkungan optimal untuk mempertahankan viabilitas dan motilitas agar meningkatkan jumlah dosis perhitungan IB dari satu kali ejakulasi akibatnya penggunaan pejantan menjadi lebih efisien. (Vasicek *et al.*, 2015)

Bahan pengencer yang digunakan adalah pengencer ringer laktat dan susu skim. Dua jenis bahan pengencer tersebut saja tidak cukup untuk mempertahankan kualitas spermatozoa sehingga perlu kombinasi tambahan yaitu dengan penambahan zat antioksidan yang terdapat pada vitamin E dan glukosa pada pengencer susu skim. Salah satu antioksidan yang dapat digunakan dalam bahan pengencer sperma adalah vitamin E, menurut Tabatabaei *et al.* (2011) dan Partyka *et al.* (2012) menyatakan bahwa penggunaan vitamin E berguna untuk melindungi membran plasma akibat radikal bebas dan peroksida lipid selama penyimpanan. Menurut Nahak *et al.* (2022) glukosa menyediakan nutrisi bagi spermatozoa, terdapat pula natrium bikarbonat dan natrium sitrat yang berperan sebagai penyangga yang dapat menjaga kestabilan pH. Glukosa merupakan sumber energi yang diperlukan untuk memperpanjang viabilitas sperma selama penyimpanan. (Gibb dan Aitken, 2016).

MATERI DAN METODE

Alat dan Bahan Penelitian

Materi yang digunakan pada penelitian ini adalah 10 ekor ayam kedu merah umur 1 tahun dengan bobot badan rata-rata 2.100 gr. Ayam diberikan pakan yaitu campuran dari jagung giling, dedak dan konsentrat petelur (40:30:30). Pakan diberikan dua kali sehari

yaitu pada pagi hari pukul 08.00 dan sore hari pada pukul 15.00 WIB, sebanyak 120 gram/ekor/hari pada serta minum diberikan secara ad libitum. Bahan-bahan lain yang digunakan yaitu vitamin E (alfa tokopherol produksi Sigma Aldrich) berbentuk bubuk, ringer laktat (produksi PT Widatra Bhakti), nacl fisiologis 3%, susu skim dengan merk tropicana slim, D(+)-Glukosa anhidrat, etanol 70%, pewarna eosin nigrosin, *aquabidest*, natrium sitrat dan fruktosa. Alat yang digunakan yaitu erlenmeyer, timbangan digital, bilik hitung / *counting chamber*, kertas pH BTB (skala 6.2-7.8), lemari pendingin, termometer, mikroskop, objek *glass*, *cover glass*, alat hitung, mikrotube 2 ml, gelas ukur, *micropipette*, tabung berskala, pengaduk, *waterbath*, rak tabung reaksi 5 ml, corong, *aluminium foil*, kertas saring *whatman* no 541.

Pembuatan bahan pengencer

Pelarutan susu skim

Susu skim dibuat dengan cara yaitu susu skim 2 gr dan 20 ml *aquabidest*, dimasukkan ke erlenmeyer dan diaduk. Panaskan air kran kemudian masukan erlenmeyer dan tunggu suhu susu skim mencapai 92°C. Setelah mencapai 92°C ditunggu selama 10 menit. Angkat erlenmeyer dan biarkan sampai dingin. Kemudian disaring menggunakan kertas saring. Tunggu sampai tersaring semuanya. Masukkan glukosa sebanyak 50 mM.

Pelarutan vitamin E

Siapkan etanol 70% dan vitamin E berupa alfa tokoferol produksi dari sigma aldrich. Perbandingan vitamin E dan etanol yaitu 1 : 5 = 0,4 gr : 2 ml. Larutan di homogenkan. (Abdillah *et al.* 2021).

Koleksi semen

Koleksi semen dilakukan menggunakan metode *massage* (pemijatan) abdominal (Malik, 2018). Pejantan ayam kedu merah sebanyak 10 ekor di koleksi menggunakan metode *massage* dilakukan dengan cara dipijat dari leher ayam sampai ke bagian pangkal ekor sampai ayam jantan terangsang dan semen akan keluar, kemudian ditampung menggunakan mikrotube.

Semen yang telah dikoleksi diencerkan dengan susu skim plus glukosa dan vitamin E dengan perbandingan 1:3.

Perlakuan pengenceran semen sebagai berikut :

1. $V_0W_0P_1 = 0,375 \text{ ml semen} + 0,84 \text{ ml pengencer Ringer Laktat}$

2. $V_0W_0P_2 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer SSK (100% SSK + 50 mM Glukosa)
3. $V_1W_0P_1 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer (99% Ringer Laktat + 1% Vit E)
4. $V_1W_0P_2 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer (99% (SSK + 50 mM Glukosa) + 1% vit E)
5. $V_2W_3P_1 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer (98% Ringer Laktat + 2% Vit E)
6. $V_2W_3P_2 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer (98% (SSK + 50 mM Glukosa) + 2% Vit E)
7. $V_3W_0P_1 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer (97% Ringer Laktat + 3% Vit E)
8. $V_3W_0P_2 = 0,375$ ml semen + 0,84 ml pengencer (97% (SSK + 50 mM Glukosa) + 3% Vit E)

Pencampuran semen segar dengan perlakuan pengencer ringer laktat dan susu skim plus glukosa 50 mM dengan level vitamin E. Setelah melakukan pengenceran, kemudian pembagian semen yang telah diencerkan ke 8 mikrotube, lalu disimpan dalam waktu yang berbeda yaitu pengamatan 0 jam dilakukan setelah pengenceran selesai, sedangkan penyimpanan waktu 2,4,6 jam disimpan dahulu dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C. Selanjutnya di evaluasi secara mikroskopis yaitu motilitas individu, integritas MPU dan viabilitas.

Pengumpulan Data

Pemeriksaan Kualitas Makroskopis dan Mikroskopis Semen Segar

a. Volume semen. Diukur melalui skala yang ada pada tempat penyadapan semen atau mikrotube.

b. Konsistensi atau kekentalan. Diamati secara kualitatif dengan memiringkan tabung penampung kemudian ditegakkan kembali, bila semen turunnya lambat berarti konsentrasinya tinggi dan jika turunnya cepat berarti konsentrasinya rendah (Garner dan Hafez, 2008).

c. Warna. Diamati secara kualitatif setelah penyadapan, semen yang baik adalah warna krem.

d. pH. Diukur dengan cara mengambil sedikit semen segar diletakkan pada kertas pH selanjutnya dilihat pH semen dengan menggunakan pH paper, pH normal semen 6,4 - 7,8 (Garner and Hafez, 2008).

e. Bau. Diamati secara kualitatif dengan cara memegang tempat penyadapan atau mikrotube, tangan di kibas-kibaskan, dan dihirup baunya, biasanya berupa bau anyir atau bau amis yang biasa disebut sebagai bau khas sperma.

f. Motilitas Massa atau gerakan massa.

Gerakan massa dilakukan menggunakan object glass yang ditetesi semen kurang lebih 10-15 μ l, diperiksa dibawah mikroskop menggunakan perbesaran 100 kali (10 x 10), kemudian diamati pergerakannya dalam 5 lapang dan dilakukan penilaian dari jumlah keseluruhan (Pandia et al., (2021). Hasil berupa cepat (+++), sedang (++) , lambat (+) dan tidak bergerak (-).

g. Gerak individu atau motilitas individu.

Diamati dengan meneteskan satu tetes semen di atas object glass dan ditambahkan larutan ringer laktat diatasnya menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Selapis tipis semen dibuat di atas gelas objek yang ditutup dan dengan gelas penutup kemudian pergerakannya diamati dalam 5 lapang pandang (Chauychu-noo et al., 2021). Kriteria motilitas spermatozoa menurut Susilawati (2011) adalah 0% : spermatozoa imotil tidak bergerak; 50% : spermatozoa bergerak melingkar, kurang dari 50% bergerak progresif dan tidak bergelombang; 50-80% : spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa; 90% : gerakan progresif yang gesit dan membentuk gelombang; 100% : gerakan sangat progresif dan gelombang sangat cepat.

h. Konsentrasi Spermatozoa. Evaluasi terhadap konsentrasi dilakukan dengan mencampurkan semen dan NaCl fisiologis 3% sebagai pengencer dengan perbandingan 1:200 (5 μ l semen : 995 μ l NaCl fisiologis 3%) di dalam mikrotube kemudian di homogenkan diputar dengan angka 8 selama 2-3 menit. Setelah itu semen ditetesi pada kamar hitung Neubauer yang ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Menghitung spermatozoa yang terdapat di dalam lima kotak dengan arah diagonal. Hasil perhitungan konsentrasi spermatozoa dalam jumlah kamar yang dihitung lima kotak dengan 80 ruangan kecil di dalamnya dikalikan 107 per milliliter. (Chankitisakul et al., 2022).

i. Viabilitas spermatozoa. Pengukurannya dilakukan dengan membuat preparate ulas memakai pewarnaan eosin nigrosine. Satu tetes semen dan 5 tetes eosin nigrosine di atas object glass kemudian dihomogenkan dan dibuat preparat ulas. Eosin berwarna merah sebagai perna spermatozoa, sedangkan nigrosin berwarna biru sebagai background. Hasil di amati di bawah mikroskop dan dihitung dalam bentuk persentase antara sperm yang hidup dan mati (Kusumawati et al., 2020).

$$\text{Viabilitas} = \frac{\sum \text{spermatozoa hidup}}{\sum \text{total spermatozoa}}$$

j. Integritas membran plasma utuh (MPU).

Diuji dengan menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Pemeriksaan MPU dengan menggunakan teknik hypoosmotic swelling test (HOST) (Revell dan Mrode, 1994). Komposisi larutan hypoosmotik terdiri : 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml. Sebanyak 20 ml larutan hypoosmotik ditambahkan dengan 0,2 ml semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian dievaluasi berdasarkan pengamatan dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus. Penilaian MPU dilakukan dalam persentase.

Rumus perhitungan = $200 - X \times 200 \times 100 \%$

X = jumlah spermatozoa rusak.

Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian diuji secara statistik dengan analisis variansi dan rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) Pola Faktorial (2x4x4) (**Steel dan Torrie 1993**). Terdapat 3 kelompok berupa penyadapan semen yaitu kelompok pertama sampai ketiga pada hari ke-1, 3, dan 5 dengan interval penyadapan 2 hari, sehingga terdapat 32 unit percobaan. Jika perlakuan berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap variabel maka dilanjutkan dengan *Orthogonal Polynomial*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Evaluasi Semen Segar Ayam Kedu Merah

Pemeriksaan dan evaluasi semen segar ayam kedu Merah meliputi pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis merupakan pengamatan yang dilakukan secara visual tanpa bantuan alat mikroskop, sedangkan pengamatan mikroskopis adalah pengamatan menggunakan bantuan alat yaitu mikroskop. (Lestari *et al.* 2022). Hasil pemeriksaan semen segar dari 10 ekor ayam Kedu Merah disajikan pada Tabel 2.

Hasil pemeriksaan makroskopis semen segar ayam kedu merah diantaranya yaitu volume semen yang berasal dari 10 ekor ayam kedu merah diperoleh dengan jumlah 2.5 ml, artinya satu ekor ayam kedu merah

menghasilkan 0.25 ml semen setiap kali ejakulasi. Hasil yang didapatkan normal dan sesuai dengan pernyataan Getachew (2016) bahwa ayam lokal pada umumnya memiliki volume rata-rata antara 0.2-0.5 ml. Derajat keasaman atau pH diukur menggunakan kertas indikator pH BTB dengan skala 6.2-6.8. Semen ayam kedu merah dalam penelitian ini menghasilkan pH yaitu 7, menunjukkan pH tersebut normal. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Garner dan Hafez (2008) bahwa pH normal semen segar pada ayam berkisar antara 6.4-7.8. Menurut Toelihere (1985) derajat keasaman (pH) semen dipengaruhi adanya proses metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerobik berupa asam laktat, semakin tinggi atau semakin rendah pH semen akan menyebabkan spermatozoa lebih cepat mengalami kematian.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar ayam kedu merah

Pemeriksaan	Hasil
Volume (ml)	2.5
pH	7
Viskositas	Kental
Warna	Putih krem
Bau	Khas
Konsentrasi (sel/mm ³) x 10 ⁶	3840
Motilitas Massa	+++
Motilitas Individu (%)	85
Viabilitas (%)	91.5
Integritas Membran Plasma Utuh (%)	58

Keterangan : (-) = buruk; (+) = sedang; (++) = baik; (+++) = sangat baik

Viskositas atau kekentalan semen ayam kedu merah memiliki viskositas kental menunjukkan bahwa semen tersebut normal. Menurut Putranto *et al.* (2020) konsentrasi spermatozoa dapat ditentukan berdasarkan warna dan kekentalan, semen dengan konsentrasi rendah umumnya memiliki viskositas encer dan warna bening sebaliknya semen dengan konsentrasi tinggi memiliki viskositas kental dan warna putih pekat. Warna pada semen ayam kedu merah menunjukkan putih krem. Hal tersebut normal dan sesuai dengan pernyataan Ax *et al.* (2008) bahwa semen yang baik adalah berwarna putih krem. Semen yang memiliki campuran warna lain mengindikasikan bahwa semen telah terkontaminasi (Kusumawati *et al.* 2020). Bau pada semen ayam kedu merah menghasilkan bau khas hal tersebut normal. Woli *et al.*, (2017) menyatakan bahwa semen

memiliki bau khas seperti bau amis khas sperma disertai dengan bau hewan itu sendiri.

Hasil pemeriksaan mikroskopis semen segar ayam kedu merah diantaranya yaitu konsentrasi dengan jumlah $4.840 \text{ (sel/mm}^3\text{)} \times 10^6$, jumlah konsentrasi yang diperoleh masih dalam kisaran normal dan sesuai dengan pendapat Santiago dan Blesbois (2020) bahwa semen ayam mengandung 4-6 miliar/mL. Motilitas massa spermatozoa ayam kedu merah menunjukkan nilai +++ yang artinya bergerak progresif. Presentase motilitas yang diperoleh dalam penelitian ini yaitu 85%. Hal tersebut lebih tinggi dari penelitian Hidayat *et al.* (2020) yaitu 83.75 ± 25 . Nilai motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP) hasil metabolisme (Danang *et al.* 2012).

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dilakukan dengan cara menghitung 200 sel spermatozoa dari preparat ulas menggunakan pewarna eosin nigrosin menghasilkan 91.5%. Menurut Haq *et al.* (2020) presentase daya hidup spermatozoa dipengaruhi lama penyimpanan karena semakin berkurang juga jumlah energi dalam pengencer. Pemeriksaan

membran plasma utuh (MPU) yang dilakukan menggunakan larutan hipoosmotik dengan teknik *hyposmotic swelling test* (HOST) pada semen ayam kedu merah menunjukkan hasil yaitu 58%. Hasil tersebut lebih tinggi dari hasil MPU pada ayam hutan dalam penelitian Bebas dan Laksmi (2015) dengan metode yang sama yaitu menghasilkan 30.00 ± 1.00 .

Motilitas Spermatozoa

Pemeriksaan motilitas merupakan parameter utama yang menunjukkan kemampuan spermatozoa membuahi ovum pada saat fertilitas (Bakst and Dymond, 2013). Menurut Zaharief *et al.* (2007) motilitas adalah salah satu diantara beberapa parameter yang penting dalam menunjukkan kemampuannya membuahi ovum. Kualitas spermatozoa yang baik ditunjukkan dengan tingginya motilitas progresif, yaitu kemampuan bergerak maju yang menentukan kecepatannya sampai pada tempat fertilisasi dan sebagai dasar informasi penilaian untuk tahap IB.

Tabel 3. Rataan nilai motilitas dan hasil analisis individu spermatozoa ayam kedu merah dengan dan tanpa penambahan pengencer dan vitamin E serta lama penyimpanan (4°C) yang berbeda

Jenis Pengencer (P)	Vitamin (V) (%)	Lama Penyimpanan (W) (Jam)				Rataan Pengencer (P)	Rataan Vitamin (V)	Rataan P*V	Hasil Analisis
		0	2	4	6				
P ₁	0	80.33 ± 5.13	79.33 ± 1.15	81.33 ± 1.15	81.33 ± 0.58	81.71 ± 2.29 ^a	80.65 ± 2.44	80.58 ± 2.47	P *
	1	81.83 ± 4.54	79 ± 2	81.67 ± 1.53	80.33 ± 0.58	80.72 ± 1.82 ^b	81.92 ± 2	80.71 ± 2.53	V ns
	2	82.83 ± 2.93	80.33 ± 1.53	83 ± 2.65	82.67 ± 2.52		81.35 ± 1.89	82.21 ± 2.39	W **
	3	81.83 ± 2.75	81 ± 2	82 ± 0	81.67 ± 1.15		80.94 ± 1.99	81.63 ± 1.58	P*V ns
P ₂	0	80.33 ± 2.31	81 ± 1	84.33 ± 2.08	82 ± 1.73		81.92 ± 2.23	81.92 ± 2.23	P* ns
	1	80 ± 0	79.67 ± 1.15	82.17 ± 0.29	81.33 ± 1.53		80.79 ± 1.34	80.79 ± 1.34	V* ns
	2	81.67 ± 3.06	82.5 ± 2.29	82.33 ± 2.08	82 ± 1		82.13 ± 1.93	82.13 ± 1.93	P*V ns
	3	79 ± 1	79 ± 1	80.67 ± 0.58	80.33 ± 1.53		79.75 ± 1.22	79.75 ± 1.22	*W ns
Rataan Waktu		80.98 ± 2.88 ^{bc}	80.23 ± 1.77 ^c	82.19 ± 1.69 ^a	81.46 ± 1.44 ^{ab}				

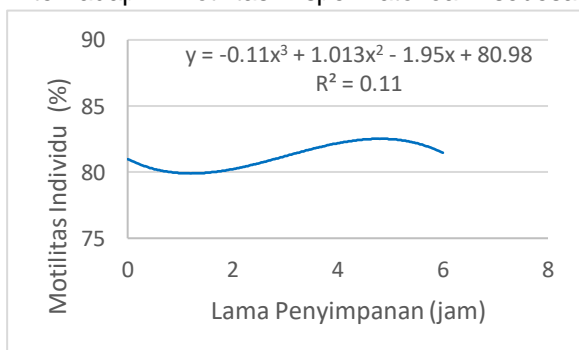
Keterangan: P₁ = Ringer laktat, P₂ = Susu skim + 50 mM glukosa 50, P = Jenis Pengencer, V = Level Vitamin, W = Lama Penyimpanan, P*V = interaksi antara jenis pengencer dan level vitamin E, P*W = interaksi antara jenis pengencer dan lama penyimpanan, V*W = interaksi antara level vitamin e dengan lama penyimpanan, P*V*W = interaksi antara jenis pengencer, level vitamin E dengan lama penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (**) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01), tanda (*) menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05), dan tanda (ns) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05); Angka yang diikuti superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Berdasarkan analisis variansi pada tabel 3 hasil interkasi antara pengencer ringer laktat dan susu skim+50 mM glukosa dengan penambahan vitamin E dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0.05$). Penggunaan jenis pengencer berpengaruh nyata ($P>0.05$) terhadap motilitas spermatozoa. Motilitas yang dihasilkan pengencer ringer laktat lebih tinggi dari pengencer susu skim plus glukosa 50mM sebesar 81.71 ± 2.29^a , sedangkan pengencer susu skim + 50 mM glukosa menghasilkan motilitas sebesar 80.72 ± 1.82^b . Hasil penelitian ini lebih tinggi sedikit dari hasil penelitian Azzam *et al.* (2022) dengan motilitas sebesar 80.20 ± 1.30 menggunakan pengencer ringer laktat dengan lama penyimpanan 2 jam, hal yang membedakan adalah adanya perbedaan strain ayam dan penambahan 10% kuning telur dalam pengencer ringer. Menurut Telnoni *et al.* (2021) ringer laktat mengandung sumber air dan elektrolit, menghasilkan efek alkalinisasi metabolik, dan mengandung sejumlah senyawa kimia, air, nilai pH, osmolaritas, dan sumber energi yang diperlukan untuk aktivitas metabolisme selama penyimpanan semen. Motilitas yang dihasilkan dengan pengencer susu skim + glukosa 50 mM sebesar 80.72 ± 1.82^b . Hasil penelitian ini lebih rendah dari laporan Saleh *et al.*, (2022) yaitu menghasilkan motilitas sebesar 82 ± 2.74 menggunakan pengencer susu skim. Hal yang membedakan adalah strain ayam dan lama penyimpanan yaitu semen selama 1 jam.

Berdasarkan hasil analisis variansi dalam tabel 3 penambahan vitamin E dengan konsentrasi berbeda tidak berpengaruh nyata ($P<0.05$) terhadap motilitas spermatozoa. Rataan terbaik untuk penambahan vitamin E sebesar 81.92 ± 2 pada konsentrasi sebanyak 1%. Hasil penelitian ini lebih baik dari laporan Amaefule *et al.* (2020) yaitu menghasilkan nilai motilitas sebesar 77.15 ± 5.81 dengan penambahan vitamin E 125mg. Hal yang menjadi pembeda adalah strain ayam, konsentrasi dan jenis vitamin E yang digunakan.

Gambar 1. Grafik pengaruh lama penyimpanan terhadap motilitas individu

Hasil analisis variansi pada faktor lama simpan berpengaruh sangat nyata ($P>0.01$) terhadap motilitas spermatozoa sebesar



$82,19\pm 1,69^a$ selama 4 jam. Kemudian dilakukan uji lanjut *orthogonal polynomial* mendapatkan hasil kubik diperoleh persamaan $y = -0.11x^3 + 1.013x^2 - 1.95x + 80.98$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 11% yang artinya setiap 1 jam akan menurunkan motilitas sebesar 0.11%. Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa penurunan motilitas seiring lamanya waktu simpan. Hal ini dikarenakan campuran bahan pengencer bekerja secara maksimal pada lama simpan 4 jam. Penurunan motilitas diikuti semakin lama waktu simpan, hal tersebut berkaitan dengan cadangan energi berupa ATP pada saat penyimpanan yang sudah mulai berkurang. Hal tersebut didukung oleh pendapat Yaman *et al.* (2021) bahwa semakin lama waktu simpan maka semakin rendah motilitas spermatozoa akibat *cold stress*, ketidakseimbangan osmotik dan adanya asam laktat akibat metabolime anaerobik.

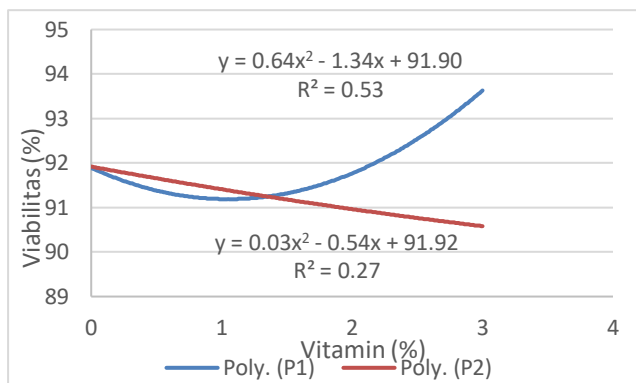
Berdasarkan hasil analisis variansi dalam tabel 3 rata-rata motilitas dari interkasi jenis pengencer dan vitamin E sebesar 82.21 ± 2.39 pada pengencer ringer laktat dengan konsentrasi vitamin E sebesar 2%. Menurut Guthrie dan Welch (2012) vitamin E dapat berkorelasi positif dengan kualitas mikroskopis semen karena vitamin E merupakan antioksidan yang dapat memotong rantai dalam reaksi peroksidasi pada saat penyimpanan (Freisleben dan Packer, 1993).

Viabilitas Spermatozoa

Berdasarkan analisis variansi pada tabel 4 hasil interkasi antara pengencer ringer laktat dan susu skim+50 mM glukosa dengan penambahan vitamin E dengan konsentrasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P>0.05$). Menurut Beconi *et al.* (1993) secara *in vitro* vitamin E mampu melindungi membran sel melawan peroksidasi lipid dengan cara menangkap radikal bebas. Namun penambahan vitamin E yang berlebih menyebabkan konsentrasi pengencer semakin pekat dan medium pengencer menjadi hipertonic, sehingga terjadi kerusakan membran plasma dan metabolisme spermatozoa terhambat. Bahan pengencer berfungsi untuk mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa, namun karena adanya kandungan gizi yang tinggi dalam pengencer maka menyebabkan adanya penurunan metabolisme sperma yang tinggi pada saat penyimpanan (Clarke *et al.* 1982).

Rataan interaksi jenis pengencer dan penambahan vitamin E terbaik sebesar $93.53 \pm 1.32c$ dalam pengencer ringer laktat dengan

penambahan 3% vitamin E dan berpengaruh sangat nyata ($P < 0.01$) terhadap viabilitas spermatozoa, kemudian dilakukan uji lanjut orthogonal polynomial pada gambar 2 mendapatkan hasil persamaan kuadrater pada P1 $-y = 0.64x^2 - 1.34x + 91.90$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 53% yang artinya setiap 0.1% vitamin E pada pengencer ringer laktat akan meningkatkan viabilitas sebesar 0.53% dan P2 $y = 0.03x^2 - 0.54x + 91.92$ koefisien determinasi (R^2) sebesar 27% yang artinya setiap 0.1% vitamin E akan menurunkan viabilitas sebesar 0.27%.



Gambar 1. Grafik Interaksi Jenis Pengencer dan Level Vitamin E terhadap Viabilitas

Berdasarkan gambar 2 menunjukkan bahwa pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa terjadi trend penurunan viabilitas yaitu semakin banyaknya konsentrasi vitamin E yang ditambahkan maka nilai viabilitas semakin menurun, sedangkan pada pengencer ringer laktat terjadi tren peningkatan yaitu semakin banyaknya konsentrasi vitamin E yang ditambahkan maka

nilai viabilitas semakin meningkat. Dalam hal ini pengencer ringer laktat lebih baik dari pada pengencer susu skim + 50 mM glukosa dalam mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa dan mempunyai interaksi terhadapnya. Vitamin E pada konsentrasi 2 % merupakan konsentrasi yang optimal untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa. hal ini diduga karena pada konsentrasi 2% vitamin E mampu mengoptimalkan kemampuannya sebagai antioksidan untuk melindungi sperma dari radikal bebas selama proses penyimpanan. Menurut Fitriyah et al. (2019) menjelaskan larutan ringer laktat yang digunakan dalam penelitian ini merupakan larutan yang terdiri dari berbagai macam garam mineral yaitu sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride, osmolaritas, Na^+ , K^+ , lactate dan kandungan sodium chloride yang sama dengan unsur-unsur elektrolit dari plasma semen ayam itu sendiri seperti natrium, clorida, kalsium dan magnesium yang memiliki daya penyangga (buffer) dan isotonik yang dapat mendukung motilitas spermatozoa dalam waktu penyimpanan yang lebih lama. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Danang et al. (2012), bahwa pengencer ringer's mengandung Na-laktat untuk mempertahankan keasaman larutan dan tekanan osmotik larutan.

Tabel 4. Rataan nilai viabilitas spermatozoa ayam kedu merah dengan penambahan pengencer dan vitamin E serta lama penyimpanan (4°C) yang berbeda

Jenis Pengencer (P)	Vitamin (V) (%)	Lama Penyimpanan (W) (Jam)				Rataan Pengencer (P)	Rataan Vitamin (V)	Rataan P*V	Hasil Analisis
		0	2	4	6				
P ₁	0	92.33 ± 2.52	92.5 ± 1.32	93 ± 2	90.17 ± 1.26	92.12 ± 1.74 ^a	91.98 ± 1.65	92 ± 1.94 ^b	P **
	1	92.17 ± 1.61	91.83 ± 1.76	92 ± 2	91.83 ± 0.76	91.22 ± 1.41 ^b	91.08 ± 1.37	91.96 ± 1.37 ^c	V ns
	2	91.33 ± 1.53	90.5 ± 1.32	91.5 ± 0.5	90.17 ± 1.89		91.58 ± 1.38	90.88 ± 1.33 ^b	W **
	3	92.33 ± 1.53	90.83 ± 1.76	91.83 ± 0.29	90.17 ± 1.26		92.03 ± 2	91.29 ± 1.44 ^a	P*V **
P ₂	0	91.33 ± 0.29	91.83 ± 0.29	93.67 ± 1.53	91.5 ± 1.5			92.08 ± 1.35 ^b	P*W ns
	1	90.83 ± 0.76	89.67 ± 0.76	92.17 ± 0.29	91.67 ± 1.53			91.08 ± 1.28 ^{bc}	V*W ns
	2	93.33 ± 1.53	94 ± 1.73	94.17 ± 1.26	92.6 ± 0.66			93.53 ± 1.32 ^c	P*V*W ns
	3	90 ± 1.32	89.5 ± 0.5	92.17 ± 0.29	90.5 ± 1.32			90.54 ± 1.34 ^c	
Rataa		91.71 ±	91.33 ±	92.56 ±	91.08 ±				

n	1.61 ^b	1.81 ^b	1.38 ^a	1.43 ^b
Waktu				

Keterangan: P₁ = Ringer laktat, P₂ = Susu skim + 50 mM glukosa 50, P = Jenis Pengencer, V = Level Vitamin, W = Lama Penyimpanan, P*V = interaksi antara jenis pengencer dan level vitamin E, P*W = interaksi antara jenis pengencer dan lama penyimpanan, V*W = interaksi antara level vitamin e dengan lama penyimpanan, P*V*W = interaksi antara jenis pengencer, level vitamin E dengan lama penyimpanan; Kolom sig. dengan tanda (**) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01), tanda (*) menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05), dan tanda (ns) menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05); Angka yang diikuti superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

KESIMPULAN

Berdasarkan data hasil penelitian Interaksi jenis pengencer dengan penambahan vitamin E berpengaruh sangat nyata terhadap viabilitas dan tidak nyata terhadap motilitas. Lama penyimpanan 4 jam waktu optimal dan cenderung lebih mempertahankan motilitas individu

SARAN

Sebaiknya lebih memperhatikan prosedur pembuatan pengencer dan jarak waktu penampungan sampai ineminasi buatan tidak terlalu lama

DAFTAR PUSTAKA

- Abdillah, L., S. Bintara, D. Maharani, and I. G. S. Budisatria. 2021. Evaluasi Penggunaan Etanol dan Surfaktan Tween 80 dalam Melarutkan Vitamin E pada Bahan Pengencer Sperma Andromed. *Buletin Peternakan Tropis* 2(2):125-129.
- Amaefule, B. C., L. E. Uzochukwu, I. E and S. O. C. Ugwu. 2020. Effect of dietary supplementation od vitamin c and e on the semen quality of local turkeys. *Agro-Science*. 19(1):25-30.
- Azzam, H. A., D. Raharjo, T. Hernawati, S. P. Madyawati dan B. Utomo. 2022. Combination of 5% Dextrose Ringer's solution and egg yolk extender maintained the motility and viability of kampung rooster spermatozoa in chilled temperature. *Ovozoa*. 11(3):109-113.
- Bakst, M. R, and J. S. Dyamond. 2013. Artificial Insemination in Poultry in Succes in Artificial Insemination. Edited by Alemayehu Lemma. Intech 176-195.
- Bebas, W., G. L. Buyona, and M. K. Budiasa. 2015. Penambahan Vitamin E pada Pengencer BTS terhadap Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Babi Landrace pada Penyimpanan 15°C. *Bul. Vet. Udayana* 8(1):1-7.
- Chakraborty, S., dan Saha, S. 2022. Understanding sperm motility mechanisms and the implication of perm surface molecules in promoting motility. *Middle East Fertil Soc Journal*. 27:1-12.
- Chankitisatul, V., W. Boonkum, T. Kaewkanha, M. Pimprasert, R. Ratchamak, S. Authaida dan P. Thananurak. 2022. *Poultry Science*. 101(12):1-6.
- Chauychu-noo, N., P. Thananurak, W. Boonkum, T. Vongpralub, dan V. Chankitisatul. 2021. Effect of organic selenium dietary supplementation on quality and fertility of cryopreserved chicken sperm. *Cryobiology*. 98:57-62.
- Clarke, R. N., Sexton, T.J., and M. A. Ottinger. 1982. Effect of Holding Temperature and Storage Time on Respiratory Rate, Motility, and Fertility of Chicken and Turkey Semen. *Poult. Sci* 61:1912-1917.
- Danang, D., N. Isnaini, and P. Trisunuwati. 2012. Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung Dalam Pengencer Ringer Pada Suhu 4°C. *Jurnal Ternak Tropika* 13(1):47-57.
- Fitriyah, N. Humaidah, and D. Suryanto. 2019. Pengaruh lama penyimpanan semen dalam pengencer ringer's laktat yang disimpan pada suhu 4°C terhadap kualitas spermatozoa ayam magon. *Jurnal rekasatwa peternakan* 1(1):28-35.
- Freisleben, H.J. and Packer, L.. 1993 Free-radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants. *Biochem. Soc. Trans*. 21(2): 325-330.
- Garner, D. L., and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animal*.
- Getachew, T. 2016. A Review Article of Artificial Insemination in Poultry. *World's Veterinary Journal*. 6 (1):26-35.
- Gibb, Z., dan R. J. Aitken. 2016. The impact of sperm metabolism during in vitro storage the stallion as a model. *Biomed. Re. Int*. 2:1-8.

- Guthrie, H. D and Welch, G. R. 2012. Effect of reactive oxygen n species on sperm function. *Theriogenology*. 78(8): 1700-1708.
- Hidayat, N., C. N. Hidayah dan A. P. Nugroho. 2020. Reduction Spermatozoa Motility and Viability on Various Local Chickens During Storage at 5°C. *Journal Animal Production*. 22(3):158-162.
- Kusumawati, E. D., A. T. N. Krisnaningsih, and A. U. K. Walangara. 2020. Kualitas spermatozoa ayam kampung dan ayam arab dengan lama simpan yang berbeda pada suhu ruang. *Jurnal Sains Peternakan* 8(1):41-56. .
- Lestari, S., D. M. Saleh, dan S. Mugiyo. 2022. Pengaruh level kuning telur pada pengencer susu skim terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ayam pelung. *Jurnal ilmu dan teknologi peternakan*. 8(2):94-103.
- Nahak, P. L., A. A. Dethan, and K. W. Kia. 2022. Kualitas Semen Babi Landrace Dalam Pengencer Semen Sitrat-Kuning Telur Yang Ditambah Glukosa Dengan Konsentrasi Berbeda. *Journal Animal Science* 7(1):12-15.
- Pandia, Y. M., W. Bebas, and T. G. O. Pelayun. 2021. Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Cemani dalam Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur pada Penyimpanan Suhu 4. *Indoneia Medicus Veterinus* 10(1):105-115.
- Partyka, A., E. Lukaszewicz dan W. Nizannki. 2012. Effect of cryopreservation on sperm parameters. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes acticity in fowl semen. *Theriogenology*. 77:1497-1504.
- Putranto, H. D., Nurmeiliasari, N., & Harferry, K. T. (2020). Studi Kualitas Semen Ayam Burgo. *Buletin Peternakan Tropis*, 1(1), 10-15.
- Revell, S.G. and R.A. M Rode. 1994. An osmotic resistancetest for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci*. 36: 77-86.
- Saleh, D. M., M. Y. Sumaryadi, A. P. Nugroho dan C. N. Hidayah. 2022. Prosiding Seminar Teknologi dan Agribisnis Peternakan IX. Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman.
- Santiago M. J., dan E. Blesbois. 2020. Functional aspects of seminal plasma in bird reproduction. *Int. J. Anim Production*.54:17-22.
- Situmorang, P. 2002. The effects of inclusion of exogenous phospholipid in tris diluent containing a different level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. *JITV*. 7(3):131-187.
- Suryani, N., N. Suthama, dan H. I. Wahyuni. 2012. Fertilitas Telur dan Mortalitas Embrio Ayam Kedu Pebibit yang Diberi Ransum dengan Peningkatan Nutrien dan Tambahan *Sacharomyces cerevisiae*. 1(1):389-404.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Tabatabaei, S., R. Batavani, dan E. Ayen. 2011. Effect of vitamin e addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. *Vet. Res. Forum*. 2:103-111.
- Taskin. A., F. Ergun, U. Karadavut dan D. Ergun. 2022. Effect of Different Extenders on Sperm Motility and Vitality in Goose Semen Cryopreservation. *Brazilian Journal of Poultry Science*.24(3):1-8.
- Telnoni, S. P., R. I. Arifiantini, dan S. Darwati. 2021. Sperm fertility od SK Kedu chicken in lactated ringer's-egg yolk extender with 10% of DMSO. *International Journal App. Biol*. 5:11663.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
- Triardi, M. Ervandi, F. Fahrullah, T. Repi dan M. A. Indrianti. 2022. Kualitas Semen Ayam KUB Menggunakan Pengencer Ringer Dextrose dan Ringer Laktat pada Suhu 50C. *Jurnal Peternakan Sriwijaya*. 11(1):42-51.
- Vasicek, J., L. Kuzelova, B. Kulikova, dan P. Chrenek. 2015. Effect of diluent and storage time on sperm characteristics of rooster insemination doses. *Avian Biol. Res*. 8:41-46.
- Yaman, M. A., M. A. Reza, A. N. Abdullah, Y. Usman dan H. Koesmara. 2021. Sperm Quality of Hibryd chicken affected by propolis, honey, or royal jelly as organic diluent material and storage periods during sperm preservation. *Proceeding of the international conference on improving tropical animal production for food security*. *Adv Biol Res*. 20:206-12.