

STATUS AKROSOM SPERMATOZOA BABI DALAM PENGECER BERBEDA YANG  
DIPRESERVASI SELAMA 3 HARI PADA SUHU 16 °C

Hermilinda Parera<sup>1\*</sup>, Victor Lenda<sup>1</sup>, Julita Merta Yasa<sup>1</sup>, Imelda Djani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>-Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Program Studi Kesehatan Hewan Jurusan Peternakan

Jl. Prof. Dr. Herman Yohanes Lasiana Kupang P.O.Box. 1152, Kupang 85011

\*e-mail: hermilinda.parera@staff.politanikoe.ac.id

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini untuk mengevaluasi kualitas dan keutuhan akrosom spermatozoa babi dalam pengencer berbeda yang di preservasi selama tiga hari pada suhu 16°C. Semen diperoleh dari 3 ekor pejantan berusia 1,5 - 1,8 tahun yang dikoleksi dua kali per minggu. Tiga kelompok pengencer yang digunakan adalah: Kelompok I :TCF+EM+KT (tris sitrat fruktosa +ekstrak mesocarp buah lontar + kuning telur), Kelompok II: TCF+EM (tris sitrat fruktosa + ekstrak mesocarp buah lontar), dan kelompok III: TCF (tris sitrat fruktosa). Semen disimpan selama 24, 48 dan 72 jam. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial dan lima ulangan. Parameter yang diukur adalah motilitas, viabilitas, keutuhan tudung akrosom. Analisis data dilakukan dengan Anova, dilanjutkan uji Duncan jika terdapat perbedaan antar perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan motilitas spermatozoa babi menurun secara signifikan ( $P<0,05$ ) seiring bertambahnya waktu penyimpanan pada suhu 16°C. Pengencer TCF+EM+KT menunjukkan motilitas yang lebih tinggi dari hari pertama hingga ketiga dibandingkan TCF+EM dan TCF. Rata-rata viabilitas spermatozoa selama 72 jam penyimpanan berkisar antara 77% - 83% dengan viabilitas tertinggi pada pengencer TCF+EM+KT ( $P<0,05$ ). Penurunan viabilitas terbesar terjadi pada pengencer TCF (12,33%), diikuti TCF+EM (10,17%) dan TCF+EM+KT (9,17%). Keutuhan akrosom juga menurun selama penyimpanan, dengan penurunan terbesar pada TCF. Keutuhan akrosom pada pengencer TCF+EM+KT lebih baik dibandingkan kedua pengencer lainnya

**Kata kunci:** Keutuhan akrosom, Spermatozoa babi, Suhu 16°C, Tris citrat fructosa

PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) pada ternak babi (*Sus scrofa domestica*) merupakan teknologi reproduksi yang paling banyak digunakan dalam industri peternakan untuk meningkatkan populasi ternak babi, memperbaiki mutu genetik dan meningkatkan produktivitas ternak dengan memanfaatkan pejantan unggul. Keberhasilan IB sangat bergantung pada kualitas spermatozoa yang digunakan, dimana umumnya IB pada babi menggunakan semen cair. Semen cair yang digunakan harus berkualitas dan memenuhi standar minimal SNI. Semen cair merupakan semen segar yang diberi tambahan bahan pengencer untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama waktu penyimpanan. Penelitian sebelumnya menggunakan pengencer tris citrat fructosa dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa babi (Parera & Lenda, 2022, 2023). Kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas, integritas membran plasma serta integritas akrosom dan yang tidak kalah pentingnya untuk mengetahui kemampuan fertilitas spermatozoa.

Salah satu aspek kritis dalam menjaga kualitas spermatozoa adalah integritas akrosom, yaitu bagian dari spermatozoa yang mengandung enzim-enzim esensial untuk penetrasi oosit saat fertilisasi. Akrosom terletak di ujung kepala spermatozoa dan dilindungi oleh membran yang sensitif terhadap kerusakan selama proses penyimpanan. Kerusakan akrosom dapat menyebabkan kegagalan reaksi akrosom, mengurangi fertilitas, dan menurunkan potensi inseminasi buatan. Spermatozoa yang disimpan pada suhu dingin mengalami kejutan dingin (*cold shock*) yang menyebabkan perubahan dalam konsentrasi cairan intraseluler dan ekstraseluler, mengakibatkan stres osmotik, yang berpotensi merusak

struktur membran dan akrosom. Suhu dingin dapat menurunkan kandungan fosfolipid, yang merupakan komponen utama membran, sehingga mengganggu stabilitas membran sel dan mengurangi kemampuannya dalam mempertahankan integritas akrosom. Selain itu penyimpanan pada suhu dingin sering kali diikuti oleh penurunan motilitas spermatozoa akibat kerusakan mitokondria, yang mengakibatkan penurunan produksi ATP (adenosine triphosphate yang diperlukan untuk motilitas dan fungsi akrosom. Spermatozoa yang tidak aktif atau mati tidak dapat melakukan reaksi akrosom dengan baik, sehingga integritas akrosom menurun.

Akrosom pada kepala spermatozoa merupakan bagian penting yang mengandung enzim-enzim esensial untuk penetrasi oosit selama fertilisasi. Membran akrosom yang utuh sangat penting dalam menjaga kemampuan fertilisasi spermatozoa (Fannessia et al., 2015). Kerusakan akrosom, terutama pada tingkat membran, dapat mengurangi kemampuan fertilisasi, menurunkan motilitas, dan menyebabkan kematian sel. Metode yang mudah dan murah untuk menilai integritas akrosom pada spermatozoa menggunakan pewarnaan giemsa (Shah & Yadav, 2016). Pada spermatozoa babi dengan akrosom yang utuh, pewarna giemsa akan memberikan warna yang lebih pekat (ungu tua) di area akrosom, menandakan keutuhan membran dan struktur protein di dalamnya. Sebaliknya, spermatozoa dengan akrosom yang rusak akan menunjukkan pola pewarnaan yang lebih samar atau tidak tampak jelas (Ungu muda), menunjukkan adanya kerusakan atau hilangnya integritas membran akrosom (Prihantoko et al., 2020). Penelitian-penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pewarnaan giemsa digunakan untuk menganalisis morfologi akrosom spermatozoa pada sapi, kambing, domba dan beberapa spesies unggas seperti ayam (Prihantoko et al., 2020; Sun et al., 2020; Yadav et al., 2019). Penggunaan pewarnaan ini membantu dalam membedakan akrosom yang utuh dari yang rusak, yang berperan penting dalam evaluasi kualitas semen.

Untuk meminimalkan efek negatif penyimpanan suhu rendah, penggunaan pengencer yang tepat sangat penting. Pengencer berfungsi untuk menjaga keseimbangan osmotik, melindungi membran spermatozoa, serta menyediakan energi bagi sel. Salah satu pengencer yang sering digunakan dalam penyimpanan semen babi adalah tris sitrat fruktosa dengan penambahan ekstrak mesocarp buah lontar dan kuning telur. Penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa pengencer tris sitrat fruktosa mampu meningkatkan viabilitas dan motilitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu rendah. Namun, meskipun pengencer ini efektif dalam melindungi motilitas spermatozoa, pengaruhnya terhadap integritas akrosom selama penyimpanan jangka pendek pada suhu 16°C masih memerlukan penelitian lebih lanjut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penyimpanan spermatozoa babi pada suhu 16°C selama tiga hari dalam pengencer tris sitrat fruktosa dengan tambahan ekstrak mesocarp buah lontar dan kuning telur terhadap integritas akrosom. Pengujian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang lebih jelas tentang efektivitas pengencer dalam melindungi akrosom dari kerusakan akibat *cold shock* dan kerusakan oksidatif. Selain itu, hasil penelitian ini akan memberikan wawasan lebih lanjut tentang potensi aplikasi pengencer ini dalam program inseminasi buatan untuk

meningkatkan keberhasilan fertilisasi

## **METODE PENELITIAN**

### **Koleksi Sampel dan Pemeriksaan Semen Segar**

Penelitian ini menggunakan semen babi 3 ekor pejantan umur 1,5- 2 tahun. Sampel semen segar diperoleh dengan metode masase. Pasca koleksi, semen segera dibawa ke laboratorium Anatomi Patologi Politani Kupang untuk dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis, meliputi pemeriksaan volume (mL), warna, pH konsistensi, konsentrasi, gerakan massa, motilitas individu, dan viabilitas spermatozoa. Semen yang memenuhi syarat dilanjutkan pengenceran hingga konsentrasi spermatozoa sebesar  $250-300 \times 10^6/\text{mL}$ , selanjutnya dibagi ke dalam kelompok perlakuan.

### **Pengenceran dan Perlakuan Semen**

Penelitian ini terdiri dari dua kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan satu yaitu lama penyimpanan terdiri dari: kelompok I: penyimpanan 24 Jam (L24): kelompok II: penyimpanan 48 jam (L48) dan kelompok III: penyimpanan 72 jam (L72) dan kelompok perlakuan ke dua yaitu kelompok pengencer dibagi menjadi tiga:

- Kelompok I yaitu: pengencer tris sitrat fruktosa dengan tambahan 5% kuning telur dan 0,01% ekstrak mesocarp buah lontar (TCF+EM+KT)
- Kelompok II yaitu: pengencer tris sitrat fruktosa yang diberi 0,01% ekstrak mesocarp buah lontar (TCF+EM)
- Kelompok ke III yaitu: pengencer tris sitrat fruktosa (TCF)

Pembuatan 100 ml pengencer tris sitrat fruktosa dengan komposisi 1,82% tris hidroksimetil aminometana, 1,11% asam sitrat monohidrat, 3,88% D-(-)fruktosa, 0,02% bovine serum albumin, 1% penisilin streptomisin, 10% kuning telur ayam, 0,01% ekstrak mesocarp buah lontar dan 82,16% aquabidest (Parera & Lenda, 2024). Sebanyak 86,16% aquabidest dimasukan dalam gelas ukur, tambahkan tris hidroksimetil aminometana, asam sitrat monohidrat, D-(-)fruktosa, bovine serum albumin dan penisilin streptomisin kemudian aduk hingga homogen, tambahkan kuning telur ayam dan ekstrak mesocarp buah lontar aduk hingga homogen, kemudian larutan pengencer ini dihangatkan sampai mencapai suhu 35-36°C dan semen segar siap ditambahkan pada pengencer ini (Parera & Lenda, 2024). Selanjutnya semen yang telah diencerkan di simpan pada suhu 16°C selama tiga hari. Pemeriksaan kualitas motilitas, viabilitas, dan tudung akrosom utuh spermatozoa dilakukan setiap hari sampai pada hari ke tiga.

### **Pemeriksaan Tudung Akrosom**

Evaluasi integritas akrosomal atau Uji Tudung Akrosom Utuh (TAU) spermatozoa dilakukan dengan menempatkan satu tetes semen di atas object glass dan diulas dengan menggunakan object glass lain membentuk sudut 45 °C dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Preparat ulas direndam dalam staning jar yang sudah berisi formalin 5% selama 30 menit.

Preparat diangkat kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, kemudian rendam preparat

dalam larutan giemsa selama 3 jam. Selanjutnya preparat dicuci menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Tudung akrosom utuh diamati menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x dan dihitung minimal 200 spermatozoa, spermatozoa dengan TAU ditandai oleh ujung kepala yang berwarna gelap keunguan dan pada spermatozoa dengan TAU tidak utuh berwarna lebih terang (Yekti et al., 2024).

### Analisis Data

Penelitian ini dirancang menggunakan rancangan acak lengkap pola factorial dengan 2 kelompok perlakuan dengan lima kali ulangan. Data evaluasi makroskopik dan mikroskopik semen segar dideskripsikan, sedangkan data persentase motilitas, viabilitas, integritas keutuhan tudung akrosom dianalisis dengan metode ANOVA, bila ada perbedaan dilanjutkan dengan Uji Duncan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Motilitas

Motilitas spermatozoa merupakan parameter standar semen cair babi yang digunakan untuk menentukan kualitas spermatozoa IB. Menurut SNI 8034 (2023), semen cair babi sesudah diawetkan (preservasi) pada suhu 15 °C sampai 20 °C pada hari ke- 3 menunjukkan motilitas spermatozoa minimum 40%. Tabel 1 menunjukkan persentase motilitas spermatozoa babi dari tiga pengencer berbeda yang disimpan selama 3 hari pada suhu 16 °C di atas 40%.

Tabel 1. Presentase Motilitas Spermatozoa Babi dari Tiga Pengencer

Pengencer	Lama Penyimpanan (Jam)		
	24	48	72
TCF+EM+KT	88.67±1.751 <sup>a A</sup>	83.17±2.137 <sup>a B</sup>	76.83±0.983 <sup>a C</sup>
TCF+EM	86.83 ± 2.317 <sup>b A</sup>	81.67± 2.066 <sup>b B</sup>	72.67± 1.966 <sup>b C</sup>
TCF	85.00± .632 <sup>c A</sup>	79.67±1.633 <sup>c B</sup>	56.33±1.506 <sup>c C</sup>

<sup>a,b,c</sup>Superskrib yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata(P<0,05); <sup>A,B,C</sup> Superskrib yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata(P<0,05).

Berdasarkan Tabel 1, terlihat bahwa rata-rata motilitas spermatozoa babi dari ketiga pengencer selama penyimpanan suhu 16°C menurun secara signifikan (P<0,05) seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan. Pengencer TCF+EM+KT memiliki presentase motilitas lebih tinggi dibandingkan pengencer TCF+ EM dan pengencer TCF. Penurunan rata-rata persentase motilitas spermatozoa babi dari jam 24, ke 48 jam dan ke 72 jam selama penyimpanan sebagai berikut pengencer TCF+EM+KT : 5,5% dan 6,34%, pengencer TCF+EM: 5,16 % dan 9% serta pengencer TCF 5,33%. dan 23,34%. Pengencer TCF+EM+KT memiliki presentase motilitas tertinggi karena selain mengandung tris sitrat dan fruktosa juga ekstrak mesocarp buah lontar yang merupakan sumber antioksidan dan kuning telur yang mengandung fosfolipid, lesitin dan kolesterol. Selama proses penyimpanan suhu dingin 16°C spermatozoa babi rentan terhadap *cold shock* sehingga berdampak pada kerusakan membran plasma, penurunan motilitas spermatozoa dan kematian spermatozoa. Fosfolipid dari kuning telur dapat menggantikan lipid membran sperma yang rusak atau kehilangan fluiditas akibat perubahan suhu (Bustani & Baiee, 2021). Dengan demikian, membran sperma tetap elastis dan mampu bertahan dari

stres akibat suhu dingin. Membran sperma yang terlindungi dengan baik memungkinkan sperma tetap mempertahankan fleksibilitas dan mobilitasnya, yang sangat penting untuk pergerakan yang efektif. Kolesterol yang terdapat dalam kuning telur juga berperan dalam menjaga integritas membran plasma sperma dengan mengurangi fase transisi lipid (Galantino-Homer et al., 2006). Kolesterol meningkatkan stabilitas membran dan mencegah membran menjadi terlalu kaku selama penyimpanan di suhu dingin (Farshad et al., 2011).

Kuning telur tidak hanya berperan sebagai pelindung membran, tetapi juga menyediakan nutrisi yang mendukung metabolisme sperma (Ferramosca & Zara, 2022). Lipid dan protein dalam kuning telur dapat digunakan sebagai sumber energi selama penyimpanan dan membantu menjaga keseimbangan energi yang diperlukan untuk motilitas sperma (Shan et al., 2021). Fruktosa dalam pengencer semen juga menyediakan energi, tetapi tambahan lipid dari kuning telur lebih mendukung proses metabolisme lipid dalam mitokondria sperma, yang penting untuk energi jangka panjang. *Cold shock* juga memicu peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS), yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada lipid dalam membran sperma. Sehingga mengurangi kemampuan sperma untuk bergerak (motilitas) dan menurunkan viabilitas sperma (Jawad et al., 2023). Lesitin dalam kuning telur dan antioksidan dari ekstrak mesocarp buah lontar membantu mencegah peroksidasi lipid dengan menetralkan ROS sebelum mereka dapat menyebabkan kerusakan pada membran sperma. Dengan mencegah peroksidasi lipid, kuning telur dan antioksidan dari ekstrak mesocarp buah lontar membantu mempertahankan integritas membran sperma selama penyimpanan pada suhu dingin.

### **Viabilitas**

Viabilitas spermatozoa, yang menunjukkan persentase sel hidup dengan membran utuh, adalah indikator penting dalam evaluasi kesuburan, karena membran yang utuh esensial untuk fungsi fertilisasi. Spermatozoa yang mempertahankan integritas membran lebih siap untuk proses kapasitasi dan reaksi akrosom, yang krusial dalam penetrasi sel telur (Chen et al., 2023). Viabilitas spermatozoa dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk kondisi penyimpanan, kualitas nutrisi dalam media pengencer, dan kandungan antioksidan, yang dapat membantu mencegah stres oksidatif serta kerusakan membran sel spermatozoa. Metode pewarnaan eosin digunakan untuk menguji viabilitas spermatozoa secara sederhana dan cepat. Prinsip dari metode ini adalah bahwa eosin, pewarna yang tidak dapat masuk ke dalam membran sel yang utuh, akan menandai hanya spermatozoa yang sudah mati atau mengalami kerusakan membran, sehingga sel mati akan tampak merah (Agarwal et al., 2016; Sharma & Agarwal, 2021). Persentase viabilitas spermatozoa babi dari tiga pengencer dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Persentase Viabilitas Spermatozoa Babi dari Tiga Pengencer

Pengencer	Lama Penyimpanan (Jam)		
	24	48	72
TCF+EM+KT	93.00±.894 <sup>aA</sup>	86.00±.894 <sup>aB</sup>	83.83±.753 <sup>aC</sup>
TCF+EM	92.00±.894 <sup>aA</sup>	85.83± 2.041 <sup>bB</sup>	81.83± 2.137 <sup>bC</sup>
TCF	89.83±.983 <sup>bA</sup>	85.17± 1.472 <sup>bB</sup>	77.50±1.378 <sup>cC</sup>

<sup>a,b,c</sup>Superskrib yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaa nyata(P<0,05); <sup>A,B,C</sup> Superskrib yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaa nyata(P<0,05).

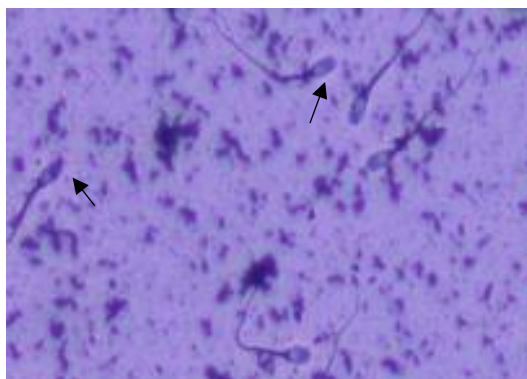
Berdasarkan tabel 2, rata-rata persentase viabilitas spermatozoa dari tiga pengencer selama penyimpanan sampai pada jam ke 72 jam adalah 77% - 83%. Persentase viabilitas spermatozoa babi dari pengencer TCF+EM+KT berbeda secara signifikan ( $P<0,05$ ) lebih tinggi dibandingkan kedua pengencer lainnya. Penurunan persentase viabilitas tertinggi dari hari 1 sampai ke 3 adalah pengencer TCF yaitu sebesar 12,33% diikuti dengan pengencer TCF+EM yaitu 10,17% dan TCF+EM+KT yaitu 9,17%.

Metode penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin selama 3 hari atau 72 jam dan menggunakan media tris sitrat fruktosa menyebabkan metabolisme fruktosa oleh spermatozoa melambat, sehingga energi yang disediakan mungkin tidak mencukupi untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas yang optimal. Selain itu, akumulasi produk sampingan metabolisme fruktosa berupa asam laktat dapat menyebabkan perubahan pH lokal dan gangguan osmotik yang dapat merusak spermatozoa. Fruktosa dalam media berfungsi sebagai sumber energi yang cepat untuk mitokondria, metabolisme yang terganggu akibat *cold shock* menyebabkan produksi energi yang tidak efisien (Tsujii et al., 2006). Setelah penyimpanan 3 hari, aktivitas mitokondria cenderung menurun, menghasilkan lebih banyak ROS dan mengurangi ketersediaan adenosine triphosphate (ATP).

Tris berfungsi sebagai penyangga untuk menjaga stabilitas pH, asam laktat yang diproduksi secara terus-menerus dapat menurunkan pH media setelah beberapa waktu. Penurunan pH di bawah ambang batas optimal (biasanya antara 7,2 hingga 7,4) dapat mengganggu aktivitas enzim penting dan keseimbangan ion, menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa. Tris sitrat membantu menjaga kestabilan pH, namun tidak cukup untuk melindungi integritas membran lipid secara menyeluruh. Fosfolipid membran, yang kaya akan asam lemak tak jenuh, menjadi lebih kaku pada suhu dingin, menyebabkan kebocoran ion-ion penting seperti kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), yang akhirnya merusak homeostasis sel dan mengganggu viabilitas spermatozoa. Enzim-enzim yang berada di membran, seperti ATPase, terganggu oleh perubahan struktur membran, yang mengganggu metabolisme ion dan menurunkan viabilitas.

### **Tudung Akrosom Utuh (TAU)**

Keutuhan tudung akrosom (TAU) pada spermatozoa babi memainkan peran yang sangat penting dalam keberhasilan fertilisasi. Tudung akrosom merupakan selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi sebagai lapisan pelindung yang sangat penting dalam menjaga integritas materi genetik serta mempertahankan enzim-enzim penting seperti hyaluronidase. Keberadaan selubung ini menjamin bahwa enzim-enzim tidak dilepaskan secara prematur dan materi genetik tetap terlindungi hingga waktu fertilisasi (Breitbart & Grinshtein, 2023). Akrosom adalah organel pada kepala spermatozoa yang berisi enzim-enzim hyaluronidase dan akrosin, yang diperlukan untuk menembus zona pellucida, selama proses fertilisasi (Khawar et al., 2019).



Gambar 1. Tanda panah menunjukkan bentuk akrosom utuh dengan pewarnaan Giemsa.

Penilaian keutuhan akrosom spermatozoa menggunakan pewarnaan giemsa, intensitas warna ungu yang dihasilkan menunjukkan kondisi integritas akrosom. Warna ungu pekat (Gambar 1) menunjukkan akrosom yang utuh, di mana membran akrosom yang stabil memungkinkan penyerapan pewarna secara optimal, mengindikasikan perlindungan yang baik terhadap enzim-enzim seperti hyaluronidase yang diperlukan untuk fertilisasi. Sebaliknya, warna ungu pucat menunjukkan adanya kerusakan pada membran akrosom, yang menyebabkan kebocoran dan distribusi pewarna yang tidak merata. Presentase Tudung Akrosom Utuh (TAU) dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Presentase Tudung Akrosom Utuh (TAU)

Pengencer	Lama Penyimpanan (Jam)		
	24	48	72
TCF+EM+KT	94,00 ± 1.095 <sup>aA</sup>	88.50 ± 1.643 <sup>aB</sup>	84.50 ± 1.225 <sup>aC</sup>
TCF+EM	89.67 ± 1.366 <sup>bA</sup>	82.33 ± 2.160 <sup>bB</sup>	76.33 ± 1.366 <sup>bC</sup>
TCF	88.83 ± 0.753 <sup>bA</sup>	80.17 ± 1.602 <sup>bB</sup>	73.17 ± 1.602 <sup>cC</sup>

<sup>a,b,c</sup>Superskrib yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ); <sup>A,B,C</sup> Superskrib yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ).

Berdasarkan tabel 3, menunjukkan persentase rata-rata keutuhan akrosom pada penyimpanan suhu 16°C selama tiga hari berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dimana spermatozoa dalam pengencer TCF+EM+KT memiliki persentase keutuhan akrosom lebih tinggi dari spermatozoa dalam pengencer TCF+EM dan TCF. Penurunan keutuhan akrosom dari jam ke 24 ke jam 48 dan 72 jam dari masing-masing pengencer sebagai berikut: TCF+EM+KT yaitu dari jam ke 24 ke jam 48 sebesar 5,5% dan ke jam 72 sebesar 4%. Pengencer TCF+EM dari jam ke 24 ke jam 48 sebesar 7,55% dan ke 72 jam sebesar 9%. Pengencer TCF dari jam ke 24 ke jam 48 sebesar 8,66% dan ke 72 jam sebesar 7%.

Spermatozoa dalam pengencer TCF+EM+KT menunjukkan penurunan paling rendah dalam integritas akrosom, yang mengindikasikan bahwa kombinasi nutrisi dalam pengencer ini lebih efektif dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan karena kuning telur mengandung lipid dan fosfolipid yang efektif melindungi membran akrosom dari kerusakan akibat *cold shock* dan stres oksidatif. Tuncer et al. (2020) dan Gadea et al. (2021) menyatakan fosfolipid dalam kuning telur membantu menjaga stabilitas membran dan mencegah kerusakan akibat *cold shock*. Penambahan antioksidan beta-karoten yang terkandung dalam ekstrak mesocarp buah lontar pada pengencer ini

mampu mengurangi peroksidasi lipid dan kerusakan membran yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (ROS) selama penyimpanan. Martínez-Alborcia et al. (2019). Beta-karoten membantu memperlambat peroksidasi lipid pada membran spermatozoa dan menjaga keutuhan akrosom. Lebih lanjut Jiménez-Rabadán et al. (2023) menegaskan pentingnya penggunaan antioksidan dalam pengencer untuk meningkatkan viabilitas dan keutuhan spermatozoa selama penyimpanan, khususnya pada suhu rendah.

Pengencer TCF+EM dan TCF menunjukkan penurunan yang lebih signifikan, terutama pada periode antara jam ke-48 dan jam ke-72, yang menunjukkan bahwa tanpa tambahan kuning telur, spermatozoa lebih rentan terhadap kerusakan. Pengencer TCF+EM juga memberikan perlindungan yang baik, namun tanpa kuning telur, tingkat perlindungan terhadap membran akrosom lebih rendah, yang menyebabkan penurunan keutuhan akrosom lebih signifikan setelah 48 dan 72 jam penyimpanan. Pengencer TCF tanpa tambahan pelindung seperti kuning telur dan ekstrak buah lontar menunjukkan penurunan persentase keutuhan akrosom yang paling tinggi, menandakan bahwa tanpa perlindungan lipid dan antioksidan, membran spermatozoa lebih rentan terhadap kerusakan oksidatif dan *cold shock* selama penyimpanan suhu rendah.

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa dari ketiga pengencer ini pengencer dengan bahan tris, sitrat fruktosa yang diberi ekstrak mesocarp buah lontar dan kuning telur (TCF+EM+KT) memberikan hasil yang lebih tinggi dari kedua pengencer lainnya dimana selama 72 jama dapat mempertahankan keutuhan tudung akrosom sebesar 84,50%, motilitas sebesar 76.83% dan viabilitas sebesar 83.83%.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Eosin-Nigrosin Staining Procedure. In A. Agarwal, S. Gupta, & R. Sharma (Eds.), *Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide* (pp. 73–77). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_8).
- Breitbart, H., & Grinshtein, E. (2023). Mechanisms That Protect Mammalian Sperm from the Spontaneous Acrosome Reaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/ijms242317005>.
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>.
- Chen, L., Song, J., Zhang, J., Luo, Z., Chen, X., Zhou, C., & Shen, X. (2023). Spermatogenic cell-specific SPACA4 is essential for efficient sperm-zona pellucida binding in vitro. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1204017>.
- Fannessia, L., Karja, N., Adnyane, I., & Setiadi, M. (2015). “Pelacakan Kerusakan Akrosom Spermatozoa Domba Selama Proses Pembekuan dengan Teknik Histokimia Lektin (Detection Of Acrosomal Damage Of Ram Spermatozoa During Freezing Process Using Lectin Histochemical Technique).” *Jurnal Veteriner*, 16(4), 560–568. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2015.16.4.560>.
- Farshad, A., Amidi, F., Khor, A. K., & Rashidi, A. (2011). Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin in presence and absence of egg yolk during freezing step on quality of markhoz buck’s spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(2), 181–189. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10141>.



- Ferramosca, A., & Zara, V. (2022). Diet and Male Fertility: The Impact of Nutrients and Antioxidants on Sperm Energetic Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052542>.
- Galantino-Homer, H. L., Zeng, W. X., Megee, S. O., Dallmeyer, M., Voelkl, D., & Dobrinski, I. (2006). Effects of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development*, 73(5), 638–650. <https://doi.org/10.1002/mrd.20437>.
- Jawad, A., Oh, D., Choi, H., Kim, M., Cai, L., Lee, J., & Hyun, S. H. (2023). Myo-inositol improves the viability of boar sperm during liquid storage. *Frontiers in Veterinary Science*, 10(July), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1150984>.
- Khawar, M. B., Gao, H., & Li, W. (2019). Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195>.
- Parera, H., & Lenda, V. (2022). Motilitas Spermatozoa Babi Dalam Berbagai Modifikasi Pengencer yang Disimpan Pada Suhu 13°C Selama 4 Hari. *Seminar Nasional Politani Kupang Ke-5 Kupang, 07 Desember 2022*, 2, 61–71.
- Parera, H., & Lenda, V. (2023). Evaluation of Motility, Viability and Abnormality of Boar Spermatozoa in Various Modified Extenders. *Jurnal Peternakan Ilmiah Terpadu*, 11(1), 13–33. <https://jurnal.fp.unila.ac.id/index.php/JIPT/article/view/6508/4577>.
- Parera, H., & Lenda, V. (2024). *Komposisi Pengencer Semen Babi Berbahan Dasar Buah Lokal* (IDS000008489). Direktorat Jenderal Kekayaan Intelektual, Kementerian Hukum Republik Indonesia. <https://pdki-indonesia.dgip.go.id/detail/d94e8149882e53604344a72bd630584bd3ed8419083761d0b1f0d44fe52cb915>.
- Prihantoko, K. D., Yuliastuti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D. T., & Budiyanto, A. (2020). The Acrosome Integrity Examination of Post-thawed Spermatozoa of Several Ongole Grade Bull in Indonesia Using Giemsa Staining Method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 478(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/478/1/012042>.
- Shah, N., & Yadav, H. P. (2016). Comparative Evaluation of Acrosomal Integrity of Bull By Two Staining Techniques. *Ruminant Science*, May 2017.
- Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., & Brenig, B. (2021). Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168767>.
- Sharma, R., & Agarwal, A. (2021). Sperm Vitality: Eosin-Nigrosin Dye Exclusion. In A. Agarwal, R. Henkel, & A. Majzoub (Eds.), *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction* (pp. 47–51). Cambridge University Press. <https://doi.org/DOI: 10.1017/9781108878715.009>.
- Sun, W., Jiang, S., Su, J., Zhang, J., Bao, X., Ding, R., Shi, P., Li, S., Wu, C., Zhao, G., Cao, G., Sun, Q. Y., Yu, H., & Li, X. (2020). The effects of cryopreservation on the acrosome structure, enzyme activity, motility, and fertility of bovine, ovine, and goat sperm. *Animal Reproduction*, 17(4), 1–10. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0219>.
- Tsujii, H., Ohta, E., Miah, A. G., Hossain, S., & Salma, U. (2006). Effect of fructose on motility, acrosome reaction and in vitro fertilization capability of boar spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, 5(4), 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2006.00150.x>.
- Yadav, D., Singh, V., Yadav, S. S., Patel, A., & Kumar, A. (2019). *Effect of glutathione on viability and acrosomal integrity of bovine spermatozoa during graded cryopreservation*. 8(3), 4796–4800.
- Yekti, A. P. A., Umamah, A. R. N., Safa, F., Andriani, N. M., Febrianto, N., & Susilawati, T. (2024). Kualitas Spermatozoa dan Tudung Akrosom Utuh pada Semen Beku Sapi Friesian Holstein dengan Mutu Genetik yang Berbeda. *Jurnal Agripet*, 24(1), 89–95. <https://doi.org/10.17969/agripet.v24i1.29097>