

Penambahan Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea americana*) dalam Pengencer CEP terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental Suhu 4-5°C

Addition of Avocado Peel Extract (Persea americana) in CEP Diluent on Spermatozoa Quality of Simmental Bull at 4-5°C

Istiqomah Indah Utami*, Nur Ducha

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya

*e-mail: istiqomahiu@gmail.com

Abstrak. Penyimpanan semen pada suhu rendah menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa salah satunya akibat *Reactive Oxygen Species* (ROS), maka dari itu dibutuhkan pengencer dengan antioksidan untuk melindungi spermatozoa. Antioksidan diperoleh salah satunya dari Ekstrak Kulit Buah Alpukat (EKBA). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan EKBA, serta memperoleh konsentrasi terbaik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi Simmental pada suhu 4-5°C. Desain penelitian yaitu Rancangan Acak Lengkap dengan 5 perlakuan pemberian konsentrasi EKBA 0%; 1%; 2%; 3%; dan 4% dengan pengulangan 4 kali. Pengamatan motilitas individu spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop cahaya perbesaran 400x. Pengamatan viabilitas spermatozoa dengan metode pewarnaan eosin-negrosin dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 400x. Pengamatan integritas membran sel spermatozoa menggunakan larutan *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) dan diamati di bawah mikroskop. Data dianalisis uji Anova satu arah dan dilanjutkan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan terdapat pengaruh signifikan penambahan EKBA terhadap kualitas spermatozoa sapi Simmental ($P < 0,05$). Perlakuan EKBA 3% menunjukkan hasil motilitas $46,25 \pm 1,85\%$, viabilitas $77,82\% \pm 0,90\%$, dan integritas membran sel spermatozoa $78,76 \pm 1,30\%$ optimal dibandingkan perlakuan lainnya. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa penambahan EKBA 3% dalam pengencer *Caudal Epididymal Plasma* (CEP) memiliki nilai tertinggi dan konsentrasi optimal untuk mempertahankan kualitas spermatozoa penyimpanan suhu 4-5°C selama 4 hari.

Kata kunci: *Persea americana*; keanekaragaman genetik dan hewan ternak; kualitas spermatozoa; pengencer CEP; Sapi Simmental

Abstract. Storage of semen at low temperatures decrease in the quality of spermatozoa, one of which is due to *Reactive Oxygen Species* (ROS), therefore a diluent with antioxidants is needed to protect spermatozoa. Antioxidants can be sourced from natural materials, for example Avocado Fruit Peel Extract (EKBA). This study was aimed to determine the effect of adding avocado peel extract, as well as concentration in maintaining the sperm quality of Simmental Bull at 4-5°C. The research design used was a completely randomized design with 5 treatments giving 0% EKBA concentration; 1%; 2%; 3%; and 4% with 4 repetitions. Motility of individual spermatozoa observations was carried out with a 400x magnification under a light microscope. Viability of spermatozoa was observed using eosin-negrosin staining method and observed with a 400x magnification under a microscope. The membrane integrity of the spermatozoa cell observation with *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST) fluid and observed under microscope. The data were analyzed using one-way ANOVA test and continued with Duncan test. The result showed that addition of EKBA significantly affected sperm quality of Simmental Bull ($p < 0.05$). The treatment of 3% EKBA showed a motility result of $46.25 \pm 1.85\%$, viability of $77.82\% \pm 0.90\%$, and membrane integrity of $78.76 \pm 1.30\%$ which was optimal compared to other treatments. Based on the results study, it can be concluded that the addition of 3% EKBA in *Caudal Epididymal Plasma* (CEP) diluent had highest value with optimal concentration in maintaining the quality of spermatozoa in storage at 4-5°C for 4 day.

Keywords: *Persea americana*; genetic diversity and farmed animals; spermatozoa quality; CEP diluent; Simmental Bull

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki jumlah penduduk setiap tahun mengalami peningkatan sehingga mengakibatkan peningkatan pula terhadap pemenuhan kebutuhan gizi terutama protein. Sumber protein salah satunya berasal dari daging ternak. Jumlah produksi daging sapi pada tahun 2022

mencapai 498,9 ton yang menunjukkan peningkatan dari tahun 2021 jumlah produksi daging sapi mencapai 487,8 ton (Badan Pusat Statistik, 2022). Upaya mencukupi produksi daging sapi nasional dibutuhkan sapi dengan kualitas baik. Salah satu ternak unggul penghasil daging yaitu sapi Simmental. Karakteristik sapi simmental memiliki karakteristik yang tidak dimiliki oleh ternak lain yaitu pertumbuhan badan cepat, mempunyai karkas yang besar, kualitas daging baik, dapat menghasilkan susu dan daging (Yasin, 2022). Peningkatan populasi dan kualitas ternak dapat dilakukan melalui bioteknologi reproduksi yaitu Inseminasi Buatan (IB) (Fania *et al.*, 2020).

Inseminasi Buatan (IB) merupakan upaya peningkatan populasi dan kualitas ternak dalam rangka peningkatan produktivitasnya di masa yang akan datang (Mugiyati *et al.*, 2017). Setelah proses penampungan, semen dipertahankan kualitasnya melalui teknik pengenceran dan penyimpanan (Kusumawati *et al.*, 2016). Menurut Duchá (2018), alternatif di wilayah keterbatasan nitrogen cair dapat menggunakan metode penyimpanan dalam *refrigerator* atau suhu 4-5°C karena memiliki keuntungan yaitu proses lebih mudah, lebih terjangkau karena tidak memerlukan nitrogen cair maupun container, dan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama 2-4 hari.

Terdapat beberapa penyebab kerusakan pada spermatozoa. Salah satu penyebab kerusakan ialah peristiwa *cold shock* akibat penyimpanan spermatozoa suhu rendah menimbulkan kerusakan membran plasma (Ducha, 2018). Perubahan struktur terjadi karena hilangnya sebagian komponen fosfolipid dan kolesterol pada membran. Faktor lain yang menyebabkan penurunan spermatozoa adalah keberadaan radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*). Penyebab lain kerusakan spermatozoa diantaranya, yaitu infeksi pada organ testis, usia, kontaminasi bahan kimia beracun, apoptosis, dan terutama ROS (Priyanto *et al.*, 2015). Kualitas spermatozoa akan menurun akibat efek dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menghasilkan peroksidasi lipid, sehingga menyebabkan perubahan fisiologi dan kimiawi sel spermatozoa dan terjadi kerusakan struktur spermatozoa (Sun *et al.*, 2019). Oleh karena itu, saat proses penyimpanan diperlukan penambahan pengencer agar kualitas spermatozoa tetap terjaga (Winangun *et al.*, 2019).

Pengencer memiliki syarat sebagai media penyimpanan yaitu murah, mudah, dan sumber nutrisi penghasil energi bagi spermatozoa (Susilawati *et al.*, 2016). Komposisi ion dan osmolaritas yang dimiliki pengencer *Caudal Epididymal Plasma* (CEP) setara dengan cairan seminalis di cauda epididymis sapi (Susilawati dan Yekti, 2018). Pada mulanya pengencer CEP ditemukan oleh Verbeckmoes dkk. (2004) lalu dimodifikasi lebih lanjut oleh Duchá (2012) dengan metode pembuatan, jenis antibiotik, dan konsentrasi kuning telur. Pengencer CEP terdiri dari larutan *aliquot* NaCl, MgCl₂(H₂O)₆, CaCl₂(H₂O), KCl, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, fruktosa, NaHCO₃, sorbitol, Tris-base, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *citric acid*, streptomisin, dan penisilin kemudian disuplementasi kuning telur sebanyak 20% (Ducha, 2018).

Kerusakan spermatozoa secara struktural maupun fungsional seringkali terjadi pada proses penyimpanan suhu rendah (Bustani dan Baiee, 2021). Salah satu penyebab kerusakan spermatozoa adalah radikal bebas. Radikal bebas sudah terkandung dalam semen segar, namun semakin lama penyimpanan jumlahnya akan terus meningkat. Menurut (Astuti *et al.*, 2009), jumlah radikal bebas yang berlebih akan mengganggu proses spermatogenesis karena radikal bebas menyebabkan kerusakan spermatozoa akibat terbentuknya lipid peroksida pada membran spermatozoa dan dalam jangka waktu tertentu jumlah spermatozoa hidup berkurang lalu spermatozoa akan mati. Untuk mencegah terjadinya akumulasi radikal bebas dalam jumlah besar, maka dibutuhkan antioksidan untuk meminimalkan pembentukan radikal bebas baru (Arnanda dan Nurwada, 2019).

Zat yang dapat mencegah atau menghambat kerusakan sel karena terjadinya radikal bebas disebut antioksidan (Artanti dan Lisnasari, 2018). Peroksidasi lipid mengakibatkan kerusakan membran pada sel spermatozoa selama proses pendinginan sehingga perlu penambahan zat antioksidan dalam pengencer (Lubis *et al.*, 2013). Antioksidan alami salah satunya adalah flavonoid. Ramadhani (2020), flavonoid berperan dalam menangkal radikal bebas. Salah satu penghasil flavonoid adalah alpukat. Kulit buah alpukat mampu mencegah atau menghambat kerusakan lipid akibat reaksi radikal bebas dalam proses oksidasi. Penelitian Isromarinah *et al.* (2022) menunjukkan bahwa dalam ekstrak etanol kulit buah alpukat mengandung antioksidan dengan nilai *Inhibition Concentration* (IC₅₀) 41,93 µg/mL dan total flavonoid 125,01 mg QE/g.

Penelitian Annisaroh dan Wibowo (2019) menunjukkan bahwa pemberian jus buah alpukat memiliki efek sebagai antioksidan terhadap motilitas spermatozoa tikus wistar dengan konsentrasi 2 ml/hari sebesar 91,2% dibandingkan motilitas tikus wistar yang tidak diberi jus buah alpukat yaitu 88%. Penelitian lain oleh Sari (2018) menunjukkan pemberian jus buah alpukat mampu meningkatkan integritas membran spermatozoa sebesar 37,00%. Penelitian ini merupakan penelitian pengembangan

dengan penggunaan CEP dan penambahan konsentrasi ekstrak kulit buah alpukat terhadap kualitas spermatozoa sapi Simmental pada suhu 4-5°C karena belum ada penelitian sebelumnya, sehingga perlu dilakukan penelitian ini merupakan novelty. Tujuan penelitian adalah mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kulit buah alpukat terbaik dalam pengencer CEP terhadap motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa Sapi Simmental.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian terdiri dari 5 perlakuan konsentrasi Ekstrak Kulit Buah Alpukat (EKBA) dengan 4 kali pengulangan pada pengencer CEP, yaitu P0 (Tanpa Penambahan EKBA); P1 (Penambahan 1% EKBA); P2 (Penambahan 2% EKBA); P3 (Penambahan 3% EKBA); dan P4 (Penambahan 4% EKBA).

Bahan pengencer CEP berdasarkan Ducha (2018) terdiri dari yaitu NaCl, MgCl₂(H₂O₆), CaCl₂(H₂O), KCl, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, fruktosa, NaHCO₃, sorbitol, Tris-base, BSA, *sitric acid*, streptomisin, dan penisilin dibuat secara *aliquot* menggunakan *sterile water* kemudian disterilisasi menggunakan membran *miliphore* ukuran 0,22 µm. Larutan CEP yang telah steril kemudian disuplementasi kuning telur 20% lalu diendapkan 3 hari dalam *refrigerator* hingga terbentuk dua lapisan yaitu supernatan dan endapan. Supernatan diambil menggunakan spuit sebagai pengencer CEP.

Kulit buah alpukat sebanyak satu kilogram dicuci bersih lalu dipotong kecil-kecil. Kulit buah alpukat kemudian dimasukkan oven suhu 50°C. Sampel yang telah kering dihaluskan menggunakan *blender* menjadi serbuk selanjutnya diekstraksi menggunakan etanol 96%. Setelah itu, simplisia disaring menggunakan kertas saring, lalu ekstrak etanol cair dikentalkan dengan *Rotary Vacuum Evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Pengencer CEP disuplementasi dengan kuning telur 20% lalu dihomogenkan. Pengencer yang telah homogen kemudian disimpan dalam *refrigerator* selama 3-5 hari hingga terbentuk dua lapisan yaitu supernatan dan endapan. Supernatan diambil menggunakan spuit sebagai pengencer CEP. Pengencer tersebut diambil dengan spuit dan dimasukkan ke dalam 5 tabung berbeda, selanjutnya ditambahkan ekstrak kulit buah alpukat yang telah ditentukan kemudian dihomogenkan. Pengencer yang telah disuplementasi dengan kuning telur 20% dan ekstrak kulit buah alpukat disimpan dalam *refrigerator* bersuhu 4-5°C.

Penampungan semen segar di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran, Jawa Tengah. Penampungan semen menggunakan metode *Artificial Vagina* (AV). Evaluasi semen segar dilakukan secara makroskopis meliputi volume, warna, bau, pH, dan konsistensi. Evaluasi mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, dan integritas membran diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x (Wijayanto *et al.*, 2019).

Proses pengenceran semen dalam *water bath* suhu 37 °C menggunakan rumus berikut.

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2 \quad (1)$$

Keterangan:

V₁ : volume semen segar sapi Simmental (µ)

M₁ : konsentrasi semen segar yang diperoleh (n x 10⁶)

V₂ : volume pengencer yang akan dibuat (µ)

M₂ : satuan konsentrasi semen sapi simmental (25 x 10⁶)

Pengujian motilitas spermatozoa dilakukan dengan mengambil semen setiap perlakuan menggunakan mikropipet lalu ditetaskan pada *object glass* selanjutnya ditutup *cover glass* dan diamati dibawah mikroskop perbesaran 40 x 10 untuk mengestimasi gerak ke depan (Azzahra *et al.*, 2016). Gerak progresif spermatozoa diketahui dari pergerakan aktif ke depan, bukan gerakan mundur dan berputar (Teethol dan Purwaningsih, 2019).

Pengujian viabilitas spermatozoa dilakukan dengan mencampurkan semen dan pewarna *eosin-negrosin* lalu dibuat apusan spermatozoa dengan meletakkan di *object glass* secara tipis dan merata. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x10. Spermatozoa hidup tidak menyerap warna, sedangkan spermatozoa yang telah mati menyerap warna khususnya pada bagian kepala spermatozoa berwarna merah-keunguan. Hasil yang didapatkan dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Viabilitas} = \frac{\text{Spermatozoa hidup}}{\text{Spermatozoa Hidup} + \text{Spermatozoa Mati}} \times 100\% \quad (2)$$

Pengujian integritas membran spermatozoa menggunakan larutan *Hypo Osmotic Swelling Test* (HOST). Purwoistri *et al.* (2013) sampel diinkubasi suhu 37°C selama 20 menit lalu diletakkan di atas *object glass* dan ditutup *cover glass* kemudian diamati menggunakan mikroskop perbesaran 40x10. Spermatozoa yang memiliki membran sel plasma utuh memiliki ekor menggulung, sedangkan spermatozoa membran sel rusak memiliki ekor lurus (Swelum *et al.*, 2018). Hasil yang didapatkan dihitung menggunakan rumus berikut.

$$\text{Integritas membran sel spermatozoa} = \frac{\text{Spermatozoa Menggulung}}{\text{Spermatozoa Menggulung} + \text{Spermatozoa Lurus}} \times 100\% \quad (3)$$

Hasil data diperoleh parameter persentase motilitas, viabilitas, dan integritas membran lalu ditransformasi menjadi *arcsin*, selanjutnya uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* lalu dilanjutkan uji statistik parametrik ANOVA satu arah, kemudian dilakukan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan nyata dari perlakuan konsentrasi EKBA menggunakan SPSS 23.00.

HASIL

Data makroskopis yang diperoleh berupa volume yang dihasilkan 6 ml, berwarna putih susu, bau khas, derajat keasaman (pH) 6,6, dan konsistensi (derajat kekentalan) yaitu kental. Data secara mikroskopis didapatkan konsentrasi semen segar 1584×10^6 , motilitas massa spermatozoa 2+, motilitas individu 70%. Oleh karena itu, semen segar tersebut tergolong normal karena telah memenuhi Standar Nasional Indonesia tahun 2017 yang memiliki standar motilitas semen segar yang dapat digunakan IB minimal $\geq 70\%$, sehingga semen layak dilanjutkan proses berikutnya yaitu pengenceran dan penyimpanan. Setelah dilakukan pengenceran motilitas minimal menjadi 50% yang sesuai dengan SNI 4869:1

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa penambahan EKBA dalam pengencer CEP berpengaruh signifikan terhadap motilitas spermatozoa sapi Simmental selama penyimpanan suhu 4-5°C ($P < 0,05$). Parameter motilitas perlakuan P3 (Penambahan 3% EKBA) selama penyimpanan 4 hari menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil Uji Duncan Tabel 1. diketahui pada P3 (Penambahan 3% EKBA) merupakan hasil paling optimal sebesar $18,75 \pm 1,06\%$ pada hari ke-4. Namun, pada perlakuan P0 (Tanpa Penambahan EKBA) sebagai kontrol menunjukkan motilitas terendah yaitu $11,25 \pm 1,31\%$. Lama penyimpanan menyebabkan nilai motilitas mengalami penurunan (Tabel 1).

Pada Tabel 1. menunjukkan adanya kecenderungan tren motilitas spermatozoa pada hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3, dan hari ke-4 menunjukkan peningkatan kualitas spermatozoa pada penambahan ekstrak kulit buah alpukat 3% serta mengalami penurunan motilitas pada konsentrasi 1%, 2%, dan 4% dengan nilai berturut-turut $42,50 \pm 1,18\%$; $43,75 \pm 3,48\%$; dan $45,63 \pm 0,72\%$. Nilai motilitas spermatozoa Sapi Simmental yang didapatkan berkisar antara $11,25 \pm 1,31$ sampai $51,88 \pm 1,37\%$. Nilai motilitas terendah didapatkan $11,25 \pm 1,31\%$ hingga penyimpanan hari ke-4 dari perlakuan P0 dan tertinggi pada P4 (EKBA 3%) dengan nilai $18,75 \pm 1,06\%$. Berdasarkan hasil penelitian penambahan EKBA dalam CEP dengan konsentrasi semakin tinggi dan lama penyimpanan dapat menyebabkan penurunan pada motilitas spermatozoa.

Tabel 1. Hasil persentase rata-rata \pm SD motilitas spermatozoa Sapi Simmental dengan penambahan EKBA dalam pengencer CEP selama penyimpanan suhu 4-5°C.

Perlakuan Ekstrak Kulit Buah Alpukat	Rerata Motilitas Selama Penyimpanan (%) [*]				
	0	1	2	3	4
0%	$51,88 \pm 1,37^b$	$33,75 \pm 0,87^a$	$23,13 \pm 0,84^a$	$13,75 \pm 1,20^a$	$11,25 \pm 1,31^a$
1%	$42,50 \pm 1,18^a$	$33,13 \pm 1,90^a$	$24,38 \pm 1,59^a$	$16,88 \pm 1,81^{ab}$	$13,75 \pm 1,20^b$
2%	$43,75 \pm 3,48^a$	$35,63 \pm 1,87^{ab}$	$25,00 \pm 1,35^a$	$18,13 \pm 1,80^b$	$14,38 \pm 1,04^{bc}$
3%	$46,25 \pm 1,85^a$	$41,88 \pm 2,18^c$	$33,13 \pm 1,46^c$	$25,63 \pm 1,58^c$	$18,75 \pm 1,06^d$
4%	$45,63 \pm 0,72^a$	$35,00 \pm 0,85^{bc}$	$29,38 \pm 1,50^b$	$20,00 \pm 2,07^b$	$16,88 \pm 1,81^{cd}$

Keterangan: ^{*})Notasi abjad berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$), sedangkan notasi sama, menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan ($P > 0,05$). Notasi a merupakan motilitas terendah, dan seterusnya.

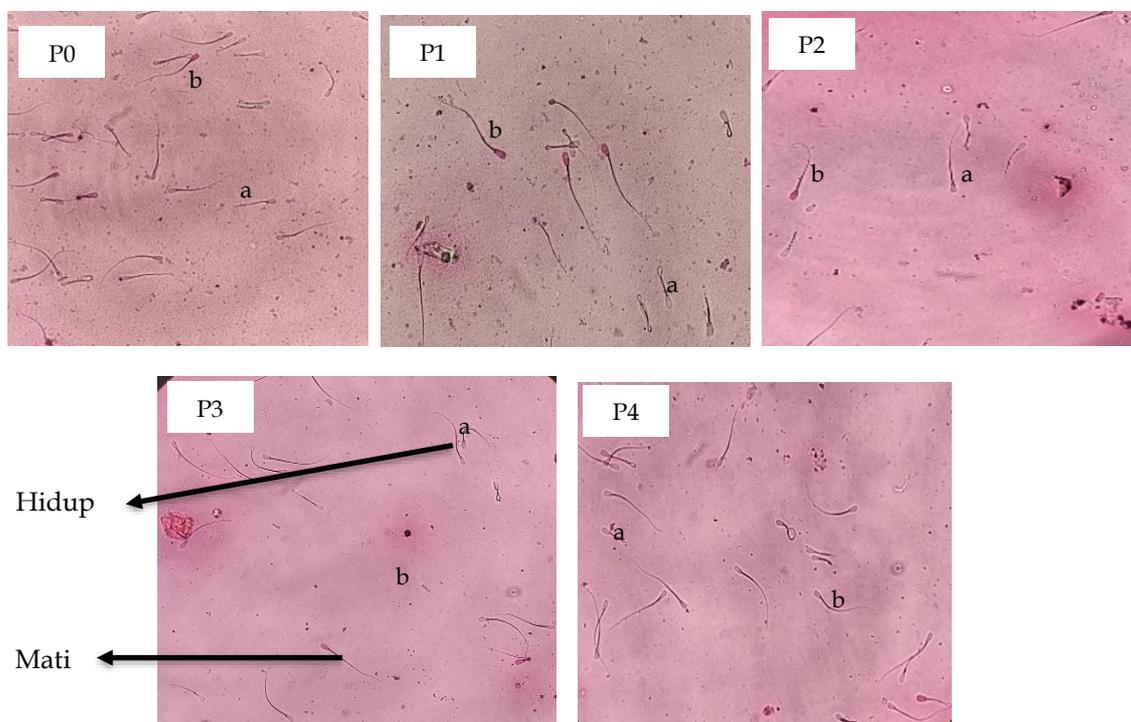
Hasil uji Anova menunjukkan bahwa penambahan EKBA dalam pengencer CEP berpengaruh signifikan terhadap viabilitas spermatozoa sapi Simmental selama penyimpanan suhu 4-5°C ($P < 0,05$). Parameter viabilitas perlakuan P3 (Penambahan 3% EKBA) selama penyimpanan 4 hari menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil Uji Duncan Tabel 2. diketahui pada P3 (Penambahan 3% EKBA) merupakan hasil yang optimal sebesar $33,67 \pm 0,92\%$ pada hari ke-4. Namun, pada perlakuan P0 (Tanpa Penambahan EKBA) sebagai kontrol menunjukkan motilitas terendah yaitu $22,84 \pm 1,24\%$. Lama penyimpanan menyebabkan nilai motilitas mengalami penurunan (Tabel 2).

Pada Tabel 2. menunjukkan adanya kecenderungan tren viabilitas spermatozoa pada hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3, dan hari ke-4 menunjukkan peningkatan kualitas spermatozoa pada penambahan ekstrak kulit buah alpukat 3% serta mengalami penurunan viabilitas pada konsentrasi 1%; 2%; dan 4% dengan nilai berturut-turut $72,52 \pm 0,99\%$; $75,07 \pm 1,16\%$; dan $75,52 \pm 1,44\%$. Nilai viabilitas spermatozoa Sapi Simmental yang didapatkan berkisar antara $22,84 \pm 1,24\%$ sampai $79,78 \pm 1,33\%$. Nilai viabilitas terendah didapatkan $22,84 \pm 1,24\%$ hingga penyimpanan hari ke-4 dari perlakuan P0 dan tertinggi pada P4 (EKBA 3%) dengan nilai $33,67 \pm 0,92\%$. Berdasarkan hasil penelitian penambahan EKBA dalam CEP dengan konsentrasi semakin tinggi dan lama penyimpanan dapat menyebabkan penurunan pada viabilitas spermatozoa.

Tabel 2. Hasil persentase rata-rata \pm SD viabilitas spermatozoa Sapi Simmental dengan penambahan EKBA dalam pengencer CEP selama penyimpanan suhu 4-5°C.

Perlakuan Ekstrak Kulit Buah Alpukat	Rerata Viabilitas Selama Penyimpanan (%) [*]				
	0	1	2	3	4
0%	$79,78 \pm 1,33^c$	$55,65 \pm 1,55^a$	$41,68 \pm 1,76^a$	$35,73 \pm 1,28^a$	$22,84 \pm 1,24^a$
1%	$72,52 \pm 0,99^a$	$57,66 \pm 0,51^{ab}$	$45,32 \pm 1,30^{ab}$	$36,78 \pm 1,36^{ab}$	$25,93 \pm 0,37^b$
2%	$75,07 \pm 1,16^{ab}$	$59,83 \pm 0,78^{bc}$	$48,74 \pm 3,99^{bc}$	$38,78 \pm 0,85^{bc}$	$29,54 \pm 0,96^c$
3%	$77,82 \pm 0,90^{bc}$	$67,33 \pm 1,18^d$	$52,53 \pm 0,87^c$	$46,10 \pm 0,68^d$	$33,67 \pm 0,92^d$
4%	$75,52 \pm 1,44^b$	$60,97 \pm 0,21^c$	$50,74 \pm 2,34^{bc}$	$41,00 \pm 0,44^c$	$31,60 \pm 0,97^{cd}$

Keterangan: ^{*})Notasi abjad berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$), sedangkan notasi sama, menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan ($P > 0,05$). Notasi a merupakan viabilitas terendah, dan seterusnya.



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa berbagai perlakuan 400x (Sumber: dokumentasi pribadi).

Keterangan: spermatozoa hidup (a); spermatozoa mati (b); P0 (Tanpa Penambahan EKBA); P1 (Penambahan 1% EKBA); P2 (Penambahan 2% EKBA); P3 (Penambahan 3% EKBA); dan P4 (Penambahan 4% EKBA).

Gambar 1 menunjukkan bahwa perlakuan penambahan EKBA 3% menghasilkan viabilitas tertinggi dibandingkan perlakuan lain. Spermatozoa hidup memiliki jumlah lebih banyak ditandai

kepala tidak berwarna dibanding spermatozoa yang telah mati ditandai kepala memiliki warna merah-keunguan.

Hasil penelitian dalam pengencer CEP dengan penambahan EKBA 0% sampai 4% pada hari ke-0 menghasilkan integritas membran spermatozoa sapi Simmental sebesar $78,02 \pm 1,14\%$ sampai dengan $22,93 \pm 1,02\%$. Pada hari ke-0 penambahan EKBA 0% sampai 4% mengalami penurunan viabilitas. Lama penyimpanan menyebabkan nilai viabilitas mengalami penurunan (Tabel 3).

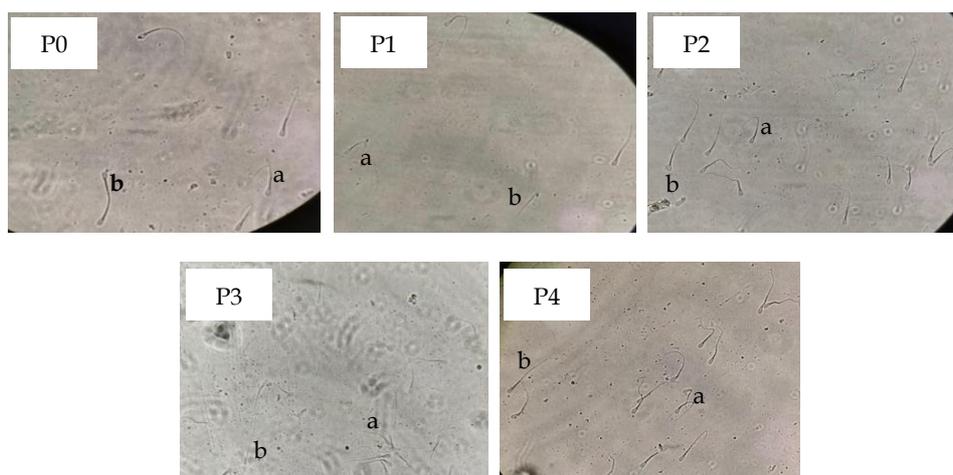
Hasil uji Anova menunjukkan bahwa penambahan EKBA dalam pengencer CEP berpengaruh signifikan terhadap integritas membran spermatozoa sapi Simmental penyimpanan suhu $4-5^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$). Parameter viabilitas perlakuan P3 (Penambahan 3% EKBA) selama penyimpanan 4 hari menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya. Hasil Uji Duncan Tabel 3. diketahui pada P3 (Penambahan 3% EKBA) merupakan hasil paling optimal sebesar $34,07 \pm 1,33\%$ pada hari ke-4. Namun, pada perlakuan P0 (Tanpa Penambahan EKBA) sebagai kontrol menunjukkan motilitas terendah yaitu $22,93 \pm 1,02\%$.

Pada Tabel 3. menunjukkan adanya kecenderungan tren integritas membran sel spermatozoa pada hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3, dan hari ke-4 menunjukkan peningkatan kualitas spermatozoa pada penambahan ekstrak kulit buah alpukat 3% serta mengalami penurunan integritas membran sel spermatozoa pada konsentrasi 1%, 2%, dan 4% dengan nilai berturut-turut $73,95 \pm 0,89\%$; $76,89 \pm 1,69\%$; dan $77,78 \pm 1,39\%$. Nilai integritas membran sel spermatozoa Sapi Simmental yang didapatkan berkisar antara $22,93 \pm 1,02\%$ sampai $78,02 \pm 1,14\%$. Nilai integritas membran sel terendah didapatkan $22,93 \pm 1,02\%$ hingga penyimpanan hari ke-4 dari perlakuan P0 dan tertinggi pada P4 (EKBA 3%) dengan nilai $34,07 \pm 1,13\%$. Berdasarkan hasil penelitian penambahan EKBA dalam CEP dengan konsentrasi semakin tinggi dan lama penyimpanan dapat menyebabkan penurunan pada integritas membran sel spermatozoa.

Tabel 3. Hasil persentase rata-rata \pm SD integritas membran spermatozoa Sapi Simmental dengan penambahan EKBA dalam pengencer CEP selama penyimpanan suhu $4-5^{\circ}\text{C}$.

Perlakuan Ekstrak Kulit Buah Alpukat	Rerata Integritas Selama Penyimpanan (%)*				
	0	1	2	3	4
0%	$78,02 \pm 1,14^b$	$57,92 \pm 0,73^a$	$39,95 \pm 1,88^a$	$36,21 \pm 0,70^a$	$22,93 \pm 1,02^a$
1%	$73,95 \pm 0,89^a$	$57,22 \pm 1,25^a$	$44,83 \pm 0,74^b$	$37,11 \pm 2,24^a$	$24,77 \pm 1,23^a$
2%	$76,89 \pm 1,69^b$	$58,70 \pm 1,76^a$	$48,31 \pm 1,89^{bc}$	$38,47 \pm 3,02^a$	$29,16 \pm 0,66^b$
3%	$78,76 \pm 1,30^b$	$68,59 \pm 0,50^c$	$51,19 \pm 0,83^c$	$47,67 \pm 1,17^b$	$34,07 \pm 1,33^c$
4%	$77,78 \pm 1,39^b$	$61,90 \pm 0,76^b$	$49,43 \pm 1,46^c$	$40,03 \pm 1,36^a$	$31,47 \pm 1,74^{bc}$

Keterangan: *)Notasi abjad berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$), sedangkan notasi sama, menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan ($P > 0,05$). Notasi a merupakan integritas membran terendah, dan seterusnya.



Gambar 2. Integritas membran spermatozoa berbagai perlakuan 400x (Sumber: dokumentasi pribadi).

Keterangan: spermatozoa hidup (a); spermatozoa mati (b); P0 (Tanpa Penambahan EKBA); P1 (Penambahan 1% EKBA); P2 (Penambahan 2% EKBA); P3 (Penambahan 3% EKBA); dan P4 (Penambahan 4% EKBA).

Gambar 2 menunjukkan bahwa perlakuan penambahan EKBA 3% menghasilkan integritas membran tertinggi dibandingkan perlakuan lain. Jumlah spermatozoa hidup ditandai dengan ekor menggulung/melingkar lebih banyak dibanding spermatozoa yang telah mati ditandai ekor lurus.

PEMBAHASAN

Penampungan semen segar pejantan sapi Simmental menghasilkan volume 6 ml; berwarna putih susu; bau khas; pH 6,6; konsistensi kental; konsentrasi 1584×10^6 , motilitas massa 2+, dan motilitas individu 70%. Semen segar tersebut dalam kondisi normal, sehingga dapat diproses ke tahap pengenceran dan penyimpanan pada suhu 4-5°C. Hal ini sesuai SNI (2017) bahwa standar motilitas minimum semen segar 70% dan untuk standar minimum setelah pengenceran minimum 50%. Pejantan sapi Simmental berumur 7 tahun menghasilkan semen segar berjumlah 6 ml. Produksi semen mengalami penurunan karena faktor umur. Sesuai dengan pernyataan Muzakkir *et al.* (2017) jumlah volume semen yang dihasilkan dipengaruhi oleh spesies, umur, dan juga dipengaruhi oleh keadaan ternak, metode koleksi, dan frekuensi penampungan. Semen segar memiliki konsentrasi 1584×10^6 dengan konsistensi kental. Semakin pekat konsistensi semen, maka konsentrasi juga semakin tinggi. Kategori penilaian oleh Susilawati (2011) menyatakan penilaian semen encer apabila memiliki konsentrasi (<1000 spermatozoa/ml), sedang (1000-1500 spermatozoa/ml), dan kental (>1500 spermatozoa/ml). Motilitas massa juga penting dalam penilaian kualitas semen. Hal ini sesuai Sulistyowati *et al.* (2018) semen segar dalam kategori normal dan diproses lanjut, jika memiliki motilitas massa 2+ layak untuk IB.

Pada Tabel 1. rerata persentase motilitas \pm Standar Deviasi (SD) spermatozoa sapi Simmental dalam pengencer CEP dengan penambahan EKBA konsentrasi 0% hingga 4% menunjukkan bahwa P3 (Penambahan EKBA 3%) memiliki rerata motilitas tertinggi sebesar $18,75 \pm 1,06\%$ pada penyimpanan hari ke-4. Tingginya persentase motilitas dikarenakan pengencer yang digunakan tepat. Menurut Ducha (2018) menyatakan bahwa pengencer CEP mengandung ion elektrolit, sumber energi berupa fruktosa, dan antibiotik. Pada pengencer CEP dilakukan penambahan kuning telur sebanyak 20% berfungsi sebagai pelindung spermatozoa. Menurut Rizal dan Riyaldi (2016), kuning telur mengandung lesitin yang berperan melindungi spermatozoa dari perubahan suhu atau *coldshock*.

Pada spermatozoa yang mengalami *cold shock* terjadi penurunan kualitas spermatozoa. Faktor lain yang menyebabkan penurunan spermatozoa adalah keberadaan radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*). Antioksidan berupa ekstrak kulit buah alpukat dalam pengencer CEP mampu menekan keberadaan radikal bebas, hal ini ditunjukkan pada perlakuan konsentrasi 3% memiliki nilai motilitas tertinggi dan merupakan konsentrasi optimal dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Hal ini dikarenakan adanya ekstrak kulit buah alpukat yang mengandung flavonoid yang mampu menghambat laju produksi radikal bebas. Dipertegas oleh Vinha *et al.* (2013), kulit buah alpukat mengandung flavonoid sebesar $44,3 \pm 3,1$ mg/100g. Flavonoid merupakan antioksidan berfungsi mengikat peroksida untuk memutuskan rantai radikal bebas serta menetralkan radikal bebas (Zulkarnain *et al.*, 2020).

Produk sisa respirasi sel secara anaerob berupa asam laktat. Penumpukan asam laktat akibat sisa metabolisme sel menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Turunnya pH pengencer menjadi asam karena adanya penumpukan asam laktat sehingga menjadi racun/toksik bagi spermatozoa bahkan mengakibatkan kematian. Menurut Blengur *et al.* (2020) spermatozoa yang sudah mati menjadi toksik bagi spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga terjadi penurunan motilitas spermatozoa. Kondisi toksik berasal dari spermatozoa yang telah mati dan mempengaruhi kondisi pengencer yang mengalami oksidasi karena penyimpanan mengakibatkan timbulnya radikal bebas yang dapat merusak keutuhan membran plasma.

Seyawa ROS dihasilkan selama proses metabolisme oleh spermatozoa (Dutta *et al.*, 2019). Kondisi ROS meningkat maka sistem antioksidan endogen tidak mampu mengatasinya. Upaya melindungi dan mempertahankan membran plasma dari serangan senyawa oksigen reaktif ialah pemberian antioksidan. Antioksidan juga berfungsi sebagai antioksidan intraseluler dalam mengurangi atau mencegah peroksidasi lipid tak jenuh di dalam dan pada dinding sel (Suryohudoyo, 2000). Tingginya konsentrasi antioksidan menyebabkan antioksidan beralih fungsi sebagai prooksidan (Tariq *et al.*, 2015). Hal tersebut dikarenakan produksi radikal bebas yang terus meningkat atau antioksidan rendah, sehingga meningkatkan stres oksidatif. Dampak dari stres oksidatif yaitu penurunan kualitas spermatozoa meliputi motilitas dan viabilitas. Selain itu, penambahan antioksidan pada konsentrasi tinggi menyebabkan konsentrasi pengencer semakin pekat dan pengencer menjadi hipertonic. Kondisi ini menyebabkan metabolisme spermatozoa menjadi

terhambat dan mengakibatkan spermatozoa kehilangan energi. Kondisi kehilangan energi diawali dengan berkurangnya produksi energi untuk bergerak sehingga motilitas spermatozoa menurun dan apabila kondisi tersebut terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Hartono, 2008).

Perlakuan ekstrak 0% tanpa penambahan ekstrak kulit buah alpukat, menunjukkan persentase motilitas terendah dibandingkan perlakuan lain. Hal ini disebabkan tidak adanya kandungan ekstrak kulit buah alpukat. Pada perlakuan konsentrasi rendah yaitu ekstrak 1% memiliki nilai motilitas rendah kedua setelah perlakuan kontrol. Konsentrasi rendah pada ekstrak kulit buah alpukat dalam pengencer CEP menunjukkan rendahnya aktivitas antioksidan dalam pengencer. Hal ini terlihat pada motilitas perlakuan ekstrak 1% yang mengalami penurunan secara drastis. Menurut penelitian Sadewo *et al.* (2019) pemberian jus alpukat pada tikus Wistar yang terpapar asap rokok berpengaruh nyata terhadap konsentrasi spermatozoa. Hal serupa dalam penelitian Ma'arif *et al.* (2019) melaporkan bahwa pemberian jus buah alpukat berpengaruh signifikan terhadap motilitas spermatozoa tikus Wistar yang terpapar asap rokok.

Berdasarkan Tabel 2, viabilitas spermatozoa sapi Simmental dalam pengencer CEP dengan penambahan EKBA konsentrasi menunjukkan bahwa P3 (Penambahan EKBA 3%) memiliki rerata viabilitas tertinggi sebesar $33,67 \pm 0,92\%$ pada penyimpanan hari ke-4. Menurut Riyadhi *et al.* (2019), viabilitas dan integritas membran saling terkait dengan persentase motilitas karena spermatozoa motil sudah pasti memiliki membran plasma hidup dan utuh. Rochmi dan Sofyan (2019) menyatakan bahwa persentase viabilitas lebih tinggi daripada motilitas, karena spermatozoa hidup belum tentu bergerak progresif.

Menurut Bansal *et al.* (2011) faktor utama penyebab menurunnya viabilitas spermatozoa yakni keberadaan radikal bebas atau ROS. ROS akan menyerang membran plasma spermatozoa yang mengakibatkan kematian spermatozoa akibat rusaknya selubung lipoprotein dalam dinding sel. Menurut Rilandana *et al.* (2021), jika selubung lipoprotein rusak, maka membran plasma spermatozoa sudah tidak bersifat membran aktif semipermeabel yang dapat dilewati zat atau senyawa secara difusi bebas, sehingga mengakibatkan zat pewarna eosin negrosin dapat melewati membran plasma tanpa hambatan. Gambar 1. menunjukkan viabilitas spermatozoa setiap perlakuan diamati di bawah mikroskop perbesaran 40×10 . Spermatozoa hidup tidak menyerap warna, namun spermatozoa yang sudah mati menyerap zat pewarna sehingga bagian kepala berwarna merah keunguan.

Pada perlakuan konsentrasi ekstrak kulit buah alpukat 0% memiliki nilai viabilitas paling rendah pada hari ke-4 yaitu 22,84%. Pada konsentrasi rendah yaitu ekstrak 1% memiliki nilai viabilitas rendah kedua setelah perlakuan kontrol yaitu sebesar 25,93%. Hal ini disebabkan tidak adanya atau rendahnya aktivitas antioksidan dari ekstrak kulit buah alpukat dalam pengencer CEP.

Pengujian integritas membran menggunakan metode HOST. Menurut Herdis (2017), spermatozoa dengan membran sel plasma utuh setelah diberi larutan HOST ekor tampak melingkar. Hal ini disebabkan karena pada sel yang memiliki membran plasma utuh, larutan masuk sel tidak dapat keluar, sehingga tekanan di dalam sel meningkat dan spermatozoa tampak memiliki ekor melingkar. Namun, pada sel yang memiliki membran plasma rusak, larutan masuk sel akan keluar kembali sehingga ekor spermatozoa tampak lurus. Nateq *et al.* (2020) mengungkapkan bahwa uji HOST digunakan untuk mengetahui kekuatan membran spermatozoa dalam menjaga sel dengan kondisi lingkungan. Menurut Anwar (2014), kerusakan membran akan mempengaruhi proses metabolisme yang berdampak pada perubahan motilitas dan viabilitas.

Pada Tabel 3, nilai P3 (Penambahan EKBA 3%) menunjukkan nilai integritas membran terbaik hingga pada pengamatan hari ke-4. Hal tersebut dikarenakan penambahan ekstrak kulit buah alpukat dengan konsentrasi optimal sehingga dapat mencegah kerusakan membran spermatozoa. Pada P0 (Tanpa penambahan EKBA 0%) memiliki nilai integritas terendah pada hari ke-4 yaitu 22,93%. Pada konsentrasi rendah yaitu ekstrak 1% memiliki nilai viabilitas rendah kedua setelah perlakuan kontrol yaitu sebesar 24,77%. Hal ini disebabkan tidak adanya atau rendahnya konsentrasi ekstrak kulit buah alpukat dalam pengencer CEP.

Dari Gambar 2, terlihat bahwa integritas membran spermatozoa setiap perlakuan diamati di bawah mikroskop perbesaran 40×10 . Spermatozoa hidup memiliki ekor menggulung, namun spermatozoa yang sudah mati memiliki ekor lurus (Swelum *et al.*, 2018). Menurut Anwar *et al.* (2014), kerusakan membran sel akan mempengaruhi proses metabolisme spermatozoa. Apabila membran plasma utuh maka metabolisme dapat berjalan baik, sehingga sel dapat mengatur keluar masuknya zat elektrolit yang diperlukan.

Keberadaan radikal bebas yaitu ROS menyebabkan integritas membran spermatozoa menurun. Upaya menghambat ROS dengan penambahan ekstrak kulit buah alpukat sebagai antioksidan yang memiliki kandungan flavonoid. Susunan elektron menjadi stabil karena zat antioksidan berupa flavonoid menangkalkan radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen (Arifin dan Ibrahim, 2018). Mekanisme lain dari kerja flavonoid yaitu mencegah terjadinya reaksi ROS dengan menghambat kerja enzim (Parwarta, 2015). Dengan kompleksnya kandungan dalam pengencer CEP yang ditambah EKBA, diduga mampu menangkalkan radikal bebas sehingga meminimalisir pembentukan hidrogen peroksida yang mencegah terbentuknya ROS dan mereduksi peroksidasi lipid sehingga kerusakan membran plasma karena akibat radikal bebas menjadi rendah.

Dari hasil analisis data diketahui bahwa pemberian EKBA 3% dalam pengencer CEP berpengaruh signifikan ($P < 0,05$) terhadap kualitas spermatozoa sapi Simmental dengan hasil optimal sampai lama penyimpanan hari ke-2 menghasilkan motilitas $41,88 \pm 2,18\%$; viabilitas $67,33 \pm 1,18\%$; integritas membran $68,59 \pm 0,50\%$ ini dapat diimplementasikan kepada peternak khususnya yang membutuhkan jangkauan biaya lebih rendah dikarenakan nilai yang dihasilkan termasuk spermatozoa yang dapat digunakan sesuai standar SNI.

SIMPULAN

Penambahan ekstrak kulit buah alpukat dalam pengencer CEP memberikan pengaruh terhadap kualitas spermatozoa Sapi Simmental. Perlakuan EKBA 3% merupakan konsentrasi terbaik dalam pengencer CEP untuk mempertahankan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas, dan integritas membran selama 4 hari dalam penyimpanan suhu $4-5^{\circ}\text{C}$. Pemberian EKBA 3% dalam pengencer CEP dapat diimplementasikan sebagai pengencer semen sapi Simmental.

DAFTAR PUSTAKA

- Annisaroh LS, dan Wibowo DA, 2019. Pengaruh Pemberian Jus Alpukat Terhadap Morfologi Spermatozoa Tikus Wistar Yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*; 8(2): 802-810.
- Anwar P, Ondho Y, dan Samsudewa D, 2014. Pengaruh Pengencer Ekstrak Air Tebu dengan Penambahan Kuning Telur terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali. *Jurnal Peternakan*; 11(2): 48-58.
- Arifin BS, dan Ibrahim, 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*; 6(1): 21-29.
- Arnanda QP, dan Nuwarda RF, 2019. Penggunaan Radiofarmaka Teknesium-99M Dari Senyawa Glutation Dan Senyawa Flavonoid Sebagai Deteksi Dini Radikal Bebas Pemicu Kanker. *Jurnal Farmaka*; 17(2): 236-243.
- Artanti AN, dan Lisnasari R, 2018. Uji aktivitas antioksidan ekstrak ethanol daun familysolanum menggunakan metode reduksi radikal bebas DPPH. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*; (2): 62.
- Astuti SD, Muchtadi A, Made B, Purwanta, dan Wresdiyati, T, 2009. Pengaruh Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon Terhadap Kadar Malonaldehid (MDA), Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) Testis dan Profil Cu, Zn-SOD Tubuli Seminiferi Testis Tikus Jantan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*; 20 (2).
- Azzahra FY, Setiatin ET, dan Samsudewa D, 2016. Evaluasi Motilitas dan Pesentase Hidup Semen Segar Sapi PO Kebumen Pejantan Muda. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*; 11(2) 99-107.
- Badan Pusat Statistika. 2022. Data Populasi Sapi Potong, (online), (<https://www.bps.go.id/indikator/24/469/1/populasi-sapi-potong-menurutprovinsi.html> diakses pada tanggal 27 Agustus 2022).
- Bansal AK, dan Bilaspuri GS, 2011. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. *Veterinary Medicine International*; 1-7.
- Blengur J, Nalley WM, and Hine TM, 2020. Pengaruh Penambahan Virgin Coconut Oil dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Selama Preservasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 7(2): 130-138.
- Bustani GS, and Baiee FH, 2021. Semen Extenders: An Evaluative Overview of Preservative Mechanisms of Semen and Semen Extender. *Veterinary World*; 14(15): 1220.
- Danang DR, Isnaini N, dan Trisunuwati P, 2012. Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung dalam Pengencer Ringer's pada Suhu 4°C . *Journal of Tropical Animal Production*; 13(1): 47-57.
- Ducha N, 2018. The Test About Blood Serum Capabilities in Maintaining The Quality of Bull Spermatozoa During Storage in CEP Diluent at Refrigerator Temperature. *Earth and Environmental Science*; 130(1): 1-5.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahyuningsih S, and Pangestu M, 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm After Storage in CEP-2 Extender with and Without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*; 15(20): 979-985.
- Dutta S, Majzoub A, and Asgarwal A, 2019. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*; 17(2): 87-97.
- Fania B, Trilaksana IGNB, dan Puja IK, 2020. Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) Pada Sapi Bali di Kecamatan Mengwi, Badung, Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*; 9(2): 177-186.

- Hartono M, 2008. Optimalisasi penambahan vitamin E dalam pengencer sitrat kuning telur untuk mempertahankan kualitas semen kambing Boer". *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture.*; 33 (1): 11-19.
- Herdis, 2017. Karakteristik Semen Segar Domba Garut Tipe Laga Pada Tiga Waktu Penampungan Semen. *Zoo Indonesia*; 26(1): 8-19.
- Isromarinah R, Rusli D, dan Sari DU, 2022. Antioxidant activity, total flavonoid, and total tannin content of ethanol extract of avocado peel (*Persea americana* Mill.). *Jurnal Ilmiah Farmasi (Scientific Journal of Pharmacy)*; 169-174.
- Kusumawati ED, Leondro H, Krisnaningsih ATN, Susilawati T, Isnaini N, dan Widhad R, 2016. Pengaruh Suhu dan Lama Simpan Semen Segar Terhadap Motilitas dan Abnormalitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa (PE). *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian*. 199-208
- Lubis TM, Dasrul CN, Thasmi, dan Akbar T, 2013. Efektivitas Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Spermatozoa Kambing Boer Setelah Penyimpanan Dingin. *Jurnal S. Pertanian*; 3(1): 347- 361.
- Ma'arif MF, Hermawati D, dan Ariani DM, 2019. Pengaruh Pemberian Jus Alpukat (*Persea americana* Mill.) Terhadap Motilitas Spermatozoa Tikus Wistar Yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*; (8): 832-840.
- Mugiyati, Salim, MA, Isnaini N, dan Susilawati T, 2017. Pengaruh Air Kelapa Merah yang Muda dan Tua Sebagai Pengencer Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer Selama Penyimpanan Dingin. *Jurnal Ternak Tropika*; 18(1): 20-26.
- Muzakkir D, Wahyuni S, Akmal M, dan Sabri M, 2017. Pengaruh Lama Ekuilibriasi terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan Menggunakan Pengencer Andromed. *Jurnal Ilmiah Peternakan*; 5(2): 115-128.
- Nateq S, Moghaddam G, Alijani, and Behnam M, 2020. The Effect of Different Levels of Nano Selenium on The Quality of Frozen-Thawed Sperm in Ram. *Journal of Applied Animal Research*; 48(1): 434-439.
- Parwarta, IM. 2015. *Antioksidan*. Universitas Udayana Press.
- Priyanto L, Arifiantini RI, dan Yusuf TL. 2015. Deteksi kerusakan DNA spermatozoa semen segar dan semen beku sapi menggunakan pewarnaan toluidine blue. *Jurnal Veteriner*; 16: 48-55
- Purwoistri RF, Susilawati T, dan Rahayu S, 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan Cauda Epididymal Plasma-2 Ditambahkan Kuning. *Jurnal Veteriner*; 14(3): 371-378.
- Ramadhani FQ, dan Suryani D, 2020. Perbandingan efektivitas hepatoprotektor ekstrak jintan hitam dan ekstrak temulawak pada kadar SGOT dan SPGT tikus yang diinduksi parasetamol. *JIMKI*; 8(2): 29-35.
- Rilandana D, Saleh D, and Nugroho A, 2021. The Effects of Different Kinds and Time of Storage at 5°C Temperature on Motility, Viability, and Abnormality of Kampung Rooster Spermatozoa. *ANGON: Journal of Animal Science and Technology*; 3(2): 184-191.
- Riyadhi, M, Wahdi A, dan Rizal M, 2019. Kriopreservasi semen kambing boer dengan konsentrasi pengencer nira aren dan gliserol berbeda. *Jurnal Ilmu Teknologi Peternakan Tropis*; 6: 1-7.
- Rizal M, dan Riyadhi M, 2016. Kualitas semen beku Kerbau Rawa yang dikriopreservasi dengan pengencer nira aren. Seminar Nasional Peternakan 2, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin.
- Rochmi SE, and Sofyan MS, 2019. A Diluent Containing Coconut Water, Fructose, and Chicken Egg Yolk Increase Rooster Sperm Quality at 5°C. *Veterinary World*; 12(7): 1116
- Sadewo GB, Hermawati D, dan Ariani MD, 2019. Pengaruh Pemberian Jus Alpukat (*Persea americana* Mill) Terhadap Konsentrasi Spermatozoa Tikus Wistar Jantan Yang Dipapar Asap Rokok. *Jurnal Kedokteran Diponegoro (Diponegoro Medical Journal)*; 8(2): 823-831.
- Sari IA, 2018. Pengaruh Pemberian Jus Buah Alpukat (*Persea americana* M) Terhadap Integritas Membran Sel Spermatozoa Studi Eksperimental pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar yang dipapar Obat Nyamuk Elektrik. Disertasi tidak diterbitkan. Semarang: PPs Unissula.
- SNI. 2017. Semen Beku-Bagian 1 : Sapi. Diakses melalui http://bibit.ditjenpkh.pertanian.go.id/sites/default/files/SNI_%204869-1-2017%20Semen%20beku%20-%20Bagian%201%20Sapi.pdf pada tanggal 27 Agustus 2022.
- Sulistiyowati D, Faris MA, Yekti APA, Wahjuningsih S, dan Susilawati T, 2018. Kualitas semen cair sapi Peranakan Ongole pada pengencer tris aminomethan kuning telur tanpa raffinosa yang disimpan pada media yang berbeda suhu. *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*; 19(1): 38-45.
- Sun L, Fan W, Wu C, Zhang S, Dai J, and Zhang D, 2019. Effect of Substituting Different Concentrations of Soybean Lecithin and Egg Yolk in Tris-Based Extender on Goat Semen Cryopreservation. *Cryobiology*; 92: 146-150.
- Suryohudoyo. 2000. *Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: CV Sagung Seto.
- Susilawati T, dan Yekti APA, 2018. *Teknologi Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Cair (Liquid Semen) Solusi Untuk Daerah yang Tidak Ada atau Sulit Nitrogen Cairan*. Universitas Brawijaya Press.
- Susilawati T, Isnaini N, Yekti, APA, Nurjanah I, Erico, dan Nolasco da costa, 2016. Keberhasilan Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku dan Semen Cair Pada Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 26 (3): 14-19.

- Susilawati, T. 2011. *Spermatzoatology*. Universitas Brawijaya Press.
- Swelum AAA, Saadeldin IM, Ba-Awadh H, and Alowaimer AN, 2018. Effects of Melatonin Implants on The Reproductive Performance and Endocrine Fuction of Camel (*Camelus dromedarius*) Bulls During The Non Breeding and Subsequent Breeding Seasons. *Theriogenology*; 119: 18-27.
- Tethool AN, dan Purwaningsih, 2019. Efek Pemberian Ekstrak Kayu Akway (*Drymis* Sp) terhadap Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus mucus* L.). *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis*; 9(1): 24-31.
- Tariq M., Khan MS, Shah MG, Nisha AR, Umer M, Hasan SM, Rahman A, Rabbani I, 2015. Exogenous antioxidants inclusion during semen cryopreservation of farm animals. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 7(3): 2273-2280.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Pauw I, and De Kruif A, 2004. Storage of fresh bovine semen in a diluent based on the ionic composition of cauda epididymal plasma. *Reproduction in Domestic Animals*.
- Vinha AF, Moreira J, and Barreiral SVP, 2013. Physicochemical parameters, phytochemical composition and antioxidant activity of the algarvian avocado (*Persea americana* Mill.). *Jurnal of Faculdade de Ciências da Saúde*; 5(12): 1916-9752.
- Wijayanto FS, Ondho YS, dan Setiatin ET, 2019. Pengaruh Frekuensi Penampungan Terhadap Kualitas Semen Segar Sapi Po Kebumen yang dievaluasi Secara Makroskopis dan Mikroskopis. *Agromedia*; 37(2): 26-33.
- Winangun K, Toha, dan Yusriana A, 2019. Kualitas Larutan Pengencer dan Kualitas Semen Domba pada Temperatur Penyimpanan yang Berbeda. *JURNAL KANDAGA*; 1(1): 1-7.
- Yasin M, 2022. *Evaluasi Nutrisi Pakan Sapi Simmental di PT Adi Boga Cipta Semarang*.
- Zulkarnain. 2020. Keanekaragaman Flora Kandidat Antioksidan Dalam Memperbaiki Kualitas Spermatozoa Yang Telah Terpapar Asap Rokok. *Jurnal UIN Alauddin*; 36-40.

Article History:

Received: 31 Juli 2023

Revised: 12 Agustus 2023

Available online: 14 Agustus 2023

Published: 30 September 2023

Authors:

Istiqomah Indah Utami, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: istiqomahiu@gmail.com

Nur Ducha, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Jl. Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: nurducha@unesa.ac.id

How this cite this article:

Utami II, Ducha N, 2023. Penambahan Ekstrak Kulit Buah Alpukat (*Persea americana*) dalam Pengencer CEP terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental Suhu 4-5°C. *LenteraBio*; 12(3): 412-422.