

**PERBANDINGAN PENAMBAHAN BETA KAROTEN ATAU GLISEROL
DALAM PENGECER TRIS KUNING TELUR TEHADAP KUALITAS
SEMEN BEKU KERBAU LUMPUR (*Bubalus Bubalis*)**

**COMPARISON OF ADDITION OF BETA CAROTENE OR GLYCEROL IN EGG
YOLK TRIS DILUENT ON FROZEN SEMEN QUALITY
MUD BUFFALO (*Bubalus Bubalis*)**

Putri Juni, Rini Elisia*, Maiyontoni, Refika Komala

Program Studi Peternakan, Departemen Agroindustri, FMIPA, Universitas Negeri Padang, Indonesia

**E-mail korespondensi: putrijuny08@gmail.com*

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas semen beku kerbau lumpur setelah ditambahkan β -karoten atau gliserol dalam pengencer tris kuning telur terhadap kualitas semen beku kerbau lumpur. Penelitian menggunakan 14 straw semen beku kerbau lumpur yang berasal dari BIB Buah Sakato, Ibul Payakumbuh. Metode penelitian eksperimen dengan analisis data menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 7 perlakuan dan 2 ulangan : P0 tanpa penambahan β -Karoten atau gliserol, perlakuan penambahan β -Karoten ke dalam Tris kuning telur konsentrasi : P1 0,1%, P2. 0,2% , P3 0,3% dan gliserol dengan konsentrasi : P4 2%, P5 4% dan P6 6%. Alat dan bahan yang digunakan seperti: mikroskop, CASA, *objec glass*, *cover glass*, sitrat, kuning telur, larutan HOS, dan pewarna *eosin-nigrosin*. Parameter pengamatan setelah proses *thawing* adalah persentase : motilitas, viabilitas, MPU, dan abnormalitas semen beku. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata motilitas sperma secara berurutan yaitu P1 57,79 \pm 5,30, P4 57,71 \pm 9,01, P0 54,62 \pm 8,92, P5 51,47 \pm 5,80, P2 49,28 \pm 7,59, P3 25,45 \pm 1,21, dan P6 25,03 \pm 1,21. Perlakuan P3 dan P6 nyata ($P < 0,05$) menurunkan angka motilitas spermatozoa setelah *thawing*. Sementara viabilitas, MPU dan abnormalitas tidak memberikan perbedaan nyata ($P > 0,05$) antarpelakuan. Dari data ini dapat disimpulkan berdasarkan penambahan β -karoten konsentrasi 0,1 %, 0,2%, 0,3% dibandingkan dengan penambahan gliserol 2%, 4%, 6% pada pengencer tris kuning telur sama-sama memberikan perbedaan nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas dan sama-sama tidak memberikan perbedaan nyata ($P > 0,05$) terhadap viabilitas, membran plasma utuh dan abnormalitas semen beku kerbau lumpur. Penambahan β -karoten sampai 0,2% atau penambahan gliserol sampai 4% mampu mempertahankan angka *post-thawing motility* (PTM) di atas 40%.

Kata Kunci: Kerbau Lumpur, β -Karoten, Gliserol, Semen Beku, Kualitas Spermatozoa

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the quality of frozen buffalo semen after adding β -carotene or glycerol to the tris egg yolk diluent on the quality of frozen buffalo semen. The study used 14 straws of frozen semen from mud buffaloes originating from BIB Buah Sakato, Ibul Payakumbuh. The

experimental research method with data analysis used a completely randomized design with 7 treatments and 2 replicates: P0 without the addition of β -carotene or glycerol, treatment with the addition of β -carotene to egg yolk tris (TKT) at concentrations: P1 0.1%, P2 0.2%, P3 0.3%, and Glycerol at concentrations: P4 2%, P5 4%, and P6 6%. The equipment and materials used included: a microscope, computer-assisted semen analysis (CASA), object glass, cover glass, 14 straws of frozen buffalo semen, citrate, egg yolk, HOS solution, and eosin-nigrosin dye. The parameters observed after the thawing process were the percentages of motility, viability, MPU, and abnormalities in frozen semen. The results of the study showed the average sperm motility in order, namely P1 57.79 ± 5.30 , P4 57.71 ± 9.01 , P0 54.62 ± 8.92 , P5 51.47 ± 5.80 , P2 49.28 ± 7.59 , P3 25.45 ± 1.21 , and P6 25.03 ± 1.21 . Treatments P3 and P6 significantly ($P < 0.05$) reduced sperm motility after thawing. Meanwhile, viability, MPU, and abnormality did not show significant differences ($P > 0.05$) between treatments. From these data, it can be concluded that the addition of β -carotene at concentrations of 0.1%, 0.2%, and 0.3% compared to the addition of glycerol at 2%, 4%, 6% in the egg yolk tris diluent, both significantly ($P < 0.05$) affected motility and did not significantly ($P > 0.05$) affect viability, intact plasma membrane, and abnormalities in frozen buffalo semen. The addition of β -carotene up to 0.2% or glycerol up to 4% was able to maintain post-thawing motility (PTM) above 40%.

Keywords: Mud Buffalo, β -Carotene, Glycerol, Frozen semen, Spermatozoa Quality

PENDAHULUAN

Peningkatan laju pertumbuhan dan mutu genetik ternak kerbau dapat dicapai melalui pemanfaatan teknologi reproduksi. Salah satunya yaitu teknologi inseminasi buatan (IB), IB merupakan teknologi reproduksi yang efektif dalam meningkatkan produktivitas ternak di Indonesia (Genesti *et al.*, 2024). Populasi kerbau nasional tercatat mencapai sekitar 2,4 juta ekor pada tahun 2023 (Dirjen PKH, 2023), namun tingkat keberhasilan IB pada kerbau masih rendah, yaitu 20–40% (Isnaini, 2020). Penggunaan semen beku dalam IB pada kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) merupakan salah satu solusi karena dinilai bermanfaat untuk meningkatkan kinerja dan potensi ternak, untuk memperbaiki kualitas genetik ternak, meningkatkan jumlah keturunan dari pejantan yang telah terbukti mempunyai sifat-sifat unggul untuk tujuan produksi tertentu, serta kekurangan pejantan.

Menurut Howley *et al.*, (2012) dalam Isnaini (2020) bahwa apabila program IB

diiringi dengan manajemen pemeliharaan dan manajemen pengaturan reproduksi yang baik, maka akan mampu meningkatkan keuntungan bagi peternak sebesar 18% dengan memaksimalkan potensi reproduksi yang ada pada ternak. Program IB dilakukan untuk mengawinkan kerbau betina dengan kerbau pejantan yang mempunyai mutu genetik yang baik, agar menghasilkan keturunan dengan mutu genetik yang unggul. Salah satu penyebab rendahnya angka kebuntingan hasil IB pada kerbau diduga karena rendahnya mutu semen beku kerbau tersebut. Hal ini disebabkan karena sperma kerbau lebih mudah rusak dibandingkan dengan sperma sapi pada saat pembekuan (Goyal *et al.*, 1996) mungkin karena kandungan protein plasma semen kerbau lebih rendah dibandingkan dengan plasma semen sapi (Rattan *et al.*, 1990). Salah satu tantangan dalam menjaga kualitas semen beku adalah kerusakan oksidatif yang terjadi selama proses pengenceran, pembekuan dan pencairan. Proses pembekuan semen menyebabkan berbagai jenis kerusakan

biologis yang dikenal sebagai cryodamage. Selama proses pengenceran, pendinginan, pembekuan hingga pencairan, spermatozoa mengalami cold shock yang mengganggu kestabilan lipid membran, pembentukan kristal es intraseluler yang merusak organel, serta perubahan osmotik yang tajam akibat perpindahan air keluar-masuk sel. Selain itu, pembekuan memicu peningkatan pembentukan ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan membran, serta fragmentasi DNA (Gharagozloo & Aitken, 2011). Kerentanan spermatozoa kerbau terhadap berbagai bentuk cryodamage ini menyebabkan penurunan motilitas, viabilitas, integritas membran, dan kualitas pasca-*thawing* lebih rendah dibandingkan dengan sapi (Goyal et al., 1996).

Pengencer yang digunakan yakni tris kuning telur, karena memiliki bahan atau zat yang diperlukan oleh spermatozoa yang merupakan sumber makanan baginya, antara lain fruktosa, laktosa, rafinosa, asam-asam amino dan vitamin dalam kuning telur sehingga spermatozoa dapat memperoleh sumber energi dalam jumlah yang cukup untuk. Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi membran sel spermatozoa untuk mencegah terjadinya stres dingin (*cold shock*) selama pendinginan pada suhu 5°C (Ervandi et al., 2013).

Selain kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler, juga dibutuhkan gliserol sebagai krioprotektan intraseluler untuk melindungi sel dari dalam. Penambahan gliserol ke dalam pengencer semen mampu meningkatkan ketahanan sel spermatozoa terhadap pembekuan dan mencegah adanya kristalisasi es pada titik beku larutan pengencer. Gliserol mampu menembus ke dalam sel karena memiliki molekul yang lebih kecil, gliserol akan menggantikan air bebas dan mengeluarkannya dari sel sehingga kerusakan spermatozoa lebih sedikit (Ariantje et al., 2013). Dosis gliserol yang umum digunakan pada semen kerbau adalah 6–7% karena terbukti

memberikan perlindungan optimal terhadap kerusakan sel tanpa menimbulkan efek toksik (Singh et al., 2019). Kerusakan selama proses pembekuan dapat diminimalisir dengan penambahan antioksidan yang berasal dari beta karoten (β -Karoten).

Pigmen alami ini memiliki kemampuan untuk menstabilkan membran sel, melindungi DNA, dan mengurangi kerusakan oksidatif pada sel sperma. Hal ini sependapat dengan beberapa penelitian terdahulu bahwa penambahan vitamin C atau β -karoten pada pengencer dapat meningkatkan ketahanan kualitas spermatozoa selama penyimpanan (Siahaan, et al 2012., Savitri, et al 2014) tentunya dengan waktu ekuilibrisasi yang tepat. Siahaan, et al 2012, menyatakan bahwa penambahan β -karoten dengan konsentrasi 0.002% memberikan hasil rata-rata motilitas dan daya hidup spermatozoa yang nyata pada spermatozoa sapi Bali *post thawing*. Dosis 0,002% β -karoten dipilih berdasarkan hasil penelitian sebelumnya karena terbukti meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa tanpa mengganggu kestabilan pengencer.

Meskipun β -karoten dan gliserol memiliki mekanisme perlindungan berbeda— β -karoten melalui aktivitas antioksidan dan gliserol melalui perlindungan osmotik-intraseluler—belum ada penelitian yang secara langsung membandingkan efektivitas kedua bahan tersebut dalam pengencer tris kuning telur khusus pada semen beku kerbau lumpur.

Penelitian ini penting karena karakteristik spermatozoa kerbau berbeda dari sapi sehingga respons terhadap krioprotektan dan antioksidan kemungkinan juga berbeda (Goyal et al., 1996).

Berdasarkan hal tersebut, peneliti tertarik melakukan penelitian yang berjudul “Perbandingan Penambahan β -Karoten atau Gliserol dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*)” di BIB Tuah Sakato Payakumbuh.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Produksi Balai Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato, Ibh, Payakumbuh, Sumatera Barat. Selama tiga bulan pada bulan Februari hingga April 2025. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah perlengkapan, *waterbath*, pinset, tisu, termometer, gelas ukur, tabung reaksi, *stop watch*, CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*), *objek glass*, *cover glass*, kertas lakmus, dan mikroskop. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah semen kerbau lumpur yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 14 straw. Seluruh straw berasal dari *satu ekor pejantan kerbau lumpur* yang telah lulus seleksi kualitas reproduksi di BIB Tuah Sakato. 14 straw berasal dari tanggal produksi yang berbeda, namun telah memenuhi standar semen segar untuk dibekukan (SNI Semen Beku Kerbau tahun 2024).

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Data yang didapat dianalisis dengan metode statistik Rancangan Acak Lengkap dengan 7 perlakuan dan 2 ulangan. Perlakuannya adalah penambahan β -Karoten dan penambahan Gliserol dilakukan sebelum pembekuan (dicampur ke dalam bahan pengencer) yaitu:

- P0 = 0% beta karoten atau gliserol
- P1 = β 1 = 0,1%
- P2 = β 2 = 0,2%
- P3 = β 3 = 0,3 %
- P4 = G1 = 2%
- P5 = G2 = 4%
- P6 = G3 = 6%

Setiap perlakuan diulang sebanyak dua kali sehingga terdapat 14 satuan percobaan. Parameter yang akan diamati dalam penelitian ini untuk menilai kualitas semen kerbau lumpur setelah *thawing* adalah sebagai berikut:

a. Post Thawing Motility (PTM)

Dianalisis menggunakan komputer CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) untuk mengamati pergerakan sperma. Analisis

dilakukan dengan pembesaran 400 \times , frame rate 60 fps, dan mengevaluasi parameter seperti motilitas progresif, kecepatan gerak rata-rata (VAP), kecepatan lurus (VSL), dan kecepatan lintasan (VCL). Setiap bidang pandang dianalisis dengan minimal 100–200 spermatozoa. Kumar *et al.* (2016) menemukan bahwa parameter motilitas progresif dan kecepatan gerak spermatozoa yang diukur dengan CASA memiliki korelasi positif yang signifikan dengan tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada kerbau. Hal ini menegaskan pentingnya evaluasi PTM dalam prediksi fertilitas. Pada prosedur *thawing*, straw semen dicairkan menggunakan *water bath* pada suhu 37°C selama 30 detik, yang merupakan metode standar untuk menjaga viabilitas dan motilitas spermatozoa. Pemilihan suhu dan durasi yang tepat penting untuk meminimalkan kerusakan akibat stres termal pada sperma beku, sehingga hasil analisis PTM menjadi lebih akurat dan dapat dijadikan indikator keberhasilan inseminasi.

$$\text{Motilitas(\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

b. Persentase Spermatozoa Hidup

Teknik penghitungan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarna, yaitu *eosin-negrosin*. Adapun cara kerjanya adalah sebagai berikut (Susilawati, 2011): Satu tetes semen yang telah di *thawing* ditetaskan pada ujung *object glass* dengan menggunakan alat penetes kecil. Larutan *eosin-negrosin* ditetaskan satu tetes di dekat semen, kemudian keduanya dicampur. Campuran tersebut kemudian ditutup dengan *object glass* lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45 dan ditarik ke arah ujung yang lain. Hasil olesan diamati pada mikroskop dengan perbesaran 400 \times , spermatozoa yang menyerap warna berarti spermatozoa tersebut mati, sedang yang tidak menyerap warna berarti hidup (Putra *et al.*, 2022).

$$\text{Viabilitas(\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

c. Persentase Membran Plasma Utuh (MPU)

Pemeriksaan keutuhan membran plasma spermatozoa menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test (HOS-Test)*. Semen 1 μ dimasukkan dalam 99 μ larutan *HOS-Test* dan dibiarkan selamama 30 menit dalam water bath (37°C). Semen ditempatkan pada *objek glass dan ditutup dengan cover glass*, kemudian diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang mengalami kerusakan membran plasma ditandai dengan ekor yang lurus sedangkan spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau menggembung (Nofa *et al.*,2017). Selanjutnya amati menggunakan mikroskop (Purwanta *et al.*, 2024).

$$\text{MPU(\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa dengan membran plasma utuh}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

d. Abnormalitas

Cara perhitungan dan pembuatan ulasan sama dengan cara menghitung viabilitas, hanya saja dibandingkan antara spermatozoa yang normal dan abnormal.

Spermatozoa abnormal bisa dilihat dan bentuk morfologi spermatozoa itu sendiri, bentuk-bentuk spermatozoa abnormal di antaranya adalah kepala yang terlalu besar, ekornya putus, ekor bercabang, ekornya melingkar dan sebagainya (Fafandri *et al.*, 2023).

$$\text{Abnormal (\%)} = \frac{\text{Jmlh spermatozoa abnormal}}{\text{Jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan semen berupa motilitas progresif spermatozoa dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara manual atau dengan menggunakan *Computer-Assisted Semen Analysis (CASA)* dengan pembesaran 400x, dianalisis minimal 100–200 sperma per bidang pandang *straw* semen dicairkan menggunakan water bath 37°C selama 30 detik untuk meminimalkan stres termal dan mempertahankan viabilitas. Persentase sperma yang motil digunakan sebagai indikator kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur dari betina, oleh karena itu motilitas spermatozoa memegang peranan penting untuk keberhasilan fertilisasi. Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan telah diolah dan disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Rataan *Post Thawing Motility (PTM)* Semen Beku Kerbau Lumpur

Perlakuan	Rata-rata
P0 (Trish KT + 0% β -Karoten + 0% Gliserol)	54,62 \pm 8,92 ^a
P1 (Trish KT + 0,1% β -Karoten)	57,79 \pm 5,30 ^a
P2 (Trish KT + 0,2% β -Karoten)	49,28 \pm 7,59 ^a
P3 (Trish KT + 0,3% β -Karoten)	25,45 \pm 1,21 ^b
P4 (Trish KT + 2% Gliserol)	57,71 \pm 9,01 ^a
P5 (Trish KT + 4% Gliserol)	51,47 \pm 5,80 ^a
P6 (Trish KT + 6% Gliserol)	25,03 \pm 1,21 ^b

Keterangan: huruf dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Berdasarkan Tabel 1 hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa penambahan β -karoten atau Gliserol berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas semen beku kerbau lumpur setelah perlakuan.

Uji lanjut menunjukkan perlakuan P3 (dengan penambahan 0,3% β -karoten) atau P6 (dengan penambahan 6% gliserol) menunjukkan perbedaan yang nyata dengan perlakuan lainnya. Hal ini diduga karena konsentrasi β -karoten pada P3 dan gliserol pada P6 lebih tinggi dari perlakuan lainnya yang justru memberikan efek negatif terhadap motilitas spermatozoa. Pada P3, β -karoten yang seharusnya berfungsi sebagai antioksidan, pada dosis tinggi justru dapat berubah menjadi pro-oksidan. Berdasarkan penelitian oleh Genc *et al.*, (2023), menyatakan bahwa β -karoten dalam konsentrasi fisiologis berfungsi sebagai antioksidan yang mampu menetralkan *reactive oxygen species* (ROS), namun pada dosis tinggi dan kondisi kaya oksigen seperti selama kriopreservasi, β -karoten rentan mengalami autooksidasi, membentuk radikal β -karoten yang reaktif. Radikal ini dapat memicu produksi ROS tambahan seperti superoksida dan peroksida lipid, yang pada akhirnya menyebabkan peroksidasi lipid membran sel, termasuk membran mitokondria spermatozoa. Akibatnya, integritas struktur dan fungsi sperma terganggu, yang ditandai dengan penurunan motilitas secara signifikan (Prakash *et al.*, 2022; Wafa *et al.*, 2021).

Meskipun gliserol berfungsi sebagai krioprotektan untuk melindungi sperma dari kerusakan akibat pembekuan, jika digunakan terlalu banyak dapat meningkatkan tekanan osmotik di sekitar sel. Penelitian oleh Gungor *et al.* (2019) menyatakan bahwa konsentrasi di atas 5% dapat menyebabkan stres osmotik yang memicu dehidrasi sel, kerusakan membran plasma, serta gangguan keseimbangan air dan ion di dalam sel. Hal ini menghambat metabolisme mitokondria yang berperan dalam pergerakan sperma, sehingga motilitasnya menurun secara nyata setelah

proses *thawing*. Tekanan osmotik yang tinggi dapat menyebabkan sperma mengalami dehidrasi berlebihan, kerusakan membran plasma, serta gangguan metabolisme. Kondisi inilah yang menyebabkan penurunan motilitas pada perlakuan P6. Hal ini juga selaras dengan temuan pada semen kerbau oleh Khalil *et al.*, (2025), yang menunjukkan bahwa meski 6% gliserol merupakan protokol standar, namun dapat menginduksi stres osmotik dan merugikan kualitas sperma.

Motilitas terendah tercatat pada P3, yaitu sebesar $25,45 \pm 1,21\%$ di bawah standar minimal motilitas semen beku yang ditetapkan oleh SNI 4869-2:2021 sebesar 40%. Hal ini mengindikasikan bahwa penggunaan β -karoten dalam dosis tinggi bisa berbalik menjadi pro-oksidan, menyebabkan stres oksidatif yang mempercepat kerusakan struktur spermatozoa. Pendapat ini diperkuat oleh Verma *et al.*, (2018), yang menjelaskan bahwa ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan selama proses kriopreservasi dapat menurunkan kualitas semen beku kerbau.

Viabilitas yang tinggi menunjukkan bahwa membran plasma spermatozoa masih utuh, yang sangat penting untuk keberhasilan pembuahan, baik melalui inseminasi buatan maupun kawin alam. Penilaian viabilitas biasanya dilakukan dengan pewarnaan *eosin-nigrosin*, yang membedakan sperma hidup dan mati berdasarkan penyerapan warna (Manehat *et al.*, 2021). Tabel 2 menunjukkan viabilitas semen beku kerbau lumpur dengan pengencer Tris kuning telur dengan penambahan β -Karoten dan gliserol.

Hasil analisis menunjukkan bahwa penambahan β -karoten atau gliserol tidak memberikan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$), terhadap viabilitas semen beku kerbau lumpur.

Dari data yang tersaji dapat dilihat kecenderungan peningkatan viabilitas pada beberapa perlakuan. Perlakuan dengan 0,3% β -karoten (P3) menghasilkan viabilitas tertinggi sebesar $56,79 \pm 7,13\%$, diikuti oleh perlakuan

(P1) sebesar $50,45 \pm 4,62\%$. Sebagai antioksidan kuat, β -karoten dapat menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan membran selama pembekuan. Meskipun tidak signifikan

secara statistik, kecenderungan ini menunjukkan adanya potensi β -karoten untuk mempertahankan viabilitas sperma selama penyimpanan.

Tabel 2. Rataan Viabilitas Semen Beku Kerbau Lumpur

Perlakuan	Rata-rata
P0 (Trish KT + 0% β -Karoten + 0% Gliserol)	48,04 \pm 9,76
P1 (Trish KT + 0,1% β -Karoten)	50,45 \pm 4,62
P2 (Trish KT + 0,2% β -Karoten)	45,45 \pm 5,76
P3 (Trish KT + 0,3% β -Karoten)	56,79 \pm 7,13
P4 (Trish KT + 2% Gliserol)	47,84 \pm 5,84
P5 (Trish KT + 4% Gliserol)	42,72 \pm 5,82
P6 (Trish KT + 6% Gliserol)	40,85 \pm 5,21

Penelitian sebelumnya oleh Eriani *et al.* (2018) menunjukkan bahwa penambahan β -karoten hingga 2,5% dalam pengencer tris kuning telur mampu meningkatkan kualitas semen beku kerbau Aceh, dengan hasil terbaik diperoleh pada dosis 0,625%. Viabilitas spermatozoa, serta integritas membran dan akrosom meningkat secara nyata tanpa menunjukkan efek toksik pada dosis tersebut. Temuan ini memperkuat hasil penelitian saat ini, di mana penambahan β -karoten pada dosis yang lebih rendah, yaitu 0,3%, juga menunjukkan kecenderungan peningkatan viabilitas spermatozoa. Hal ini mengindikasikan bahwa β -karoten tetap memberikan efek protektif meskipun digunakan dalam konsentrasi rendah. Sejalan dengan literatur yang ada, dosis optimal β -karoten untuk menjaga kualitas semen beku kerbau berada pada kisaran rendah hingga sedang, yakni sekitar 0,6–0,7%, sedangkan penggunaan β -karoten dalam konsentrasi tinggi (di atas 1,25%) tidak terbukti memberikan peningkatan tambahan yang signifikan terhadap kualitas semen. Oleh karena itu, penggunaan dosis rendah seperti 0,3% dapat dipertimbangkan sebagai pendekatan yang efisien dan aman dalam formulasi pengencer, khususnya untuk

mempertahankan viabilitas spermatozoa selama proses pembekuan dan penyimpanan.

Sementara itu, penggunaan gliserol dalam pengencer menunjukkan kecenderungan penurunan viabilitas seiring dengan meningkatnya konsentrasi. Pada P4 (2% gliserol), viabilitas sebesar $47,84 \pm 5,84\%$ masih relatif tinggi, namun menurun pada P5 (4%) menjadi $42,72 \pm 5,82\%$, dan pada P6 (6%) turun hingga $40,85 \pm 5,21\%$. Meskipun gliserol berfungsi sebagai krioprotektan untuk melindungi sel dari kerusakan akibat pembekuan, pada dosis tinggi dapat menyebabkan stres osmotik yang merusak membran sel. Gunawan *et al.*, (2023) menjelaskan bahwa penggunaan gliserol lebih dari 5% tanpa adaptasi bertahap dapat mengurangi viabilitas karena menyebabkan dehidrasi dan efek toksik terhadap spermatozoa.

Menurut Standar Nasional Indonesia (SNI) 4869-2:2021 tentang semen beku kerbau, viabilitas spermatozoa setelah *thawing* harus minimal 40%. Dalam penelitian ini, semua perlakuan (P1–P6) masih berada di atas batas tersebut, termasuk P6 (6% gliserol) yang mencatat viabilitas 40,85%. Perlakuan P3 (0,3% β -karoten) terlihat paling menjanjikan, karena memberikan hasil tertinggi dan tetap dalam batas aman. Selain itu, formulasi dengan β -

karoten tampak lebih stabil dibandingkan dengan gliserol yang pada konsentrasi tinggi dapat memperburuk kualitas semen.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan β -karoten hingga 0,3% dalam pengencer semen dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa dan mempertahankan kualitas pasca-*thawing*. Penggunaan gliserol perlu dikontrol agar tidak melebihi ambang toksisitas, yakni tidak lebih dari 5–6%. Dengan demikian, kombinasi β -karoten dosis optimal dan gliserol dalam

konsentrasi rendah berpotensi menjadi formula yang lebih aman dan efektif untuk produksi semen beku kerbau.

Membran plasma utuh (MPU) merupakan salah satu indikator penting dalam menilai kualitas semen beku karena mencerminkan integritas struktural dari spermatozoa, yang sangat menentukan keberhasilan fertilisasi. Tabel 3 menunjukkan membran plasma utuh semen beku kerbau lumpur dengan pengencer Tris kuning telur dengan penambahan β -Karoten dan gliserol.

Tabel 3. Rataan MPU Semen Beku Kerbau Lumpur.

Perlakuan	Rata-rata
P0 (Trish KT + 0% β -Karoten + 0% Gliserol)	31,66±0,46
P1 (Trish KT + 0,1% β -Karoten)	33,84±3,02
P2 (Trish KT + 0,2% β -Karoten)	29,19±0,74
P3 (Trish KT + 0,3% β -Karoten)	26,63±2,11
P4 (Trish KT + 2% Gliserol)	33,24±4,21
P5 (Trish KT + 4% Gliserol)	31,77±2,85
P6 (Trish KT + 6% Gliserol)	30,09±0,17

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan β -karoten atau penambahan Gliserol tidak memberikan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) terhadap membran plasma utuh (MPU) semen beku kerbau lumpur.

Hal ini menunjukkan bahwa penambahan β -karoten dalam dosis rendah mampu memberikan perlindungan terhadap membran sel spermatozoa selama proses pembekuan dan pencairan. Sebagai antioksidan, β -karoten berperan dalam menetralkan radikal bebas dan menjaga kestabilan lipid membran, sehingga mengurangi risiko kerusakan akibat stres oksidatif.

Peningkatan MPU pada perlakuan P1 ini selaras dengan hasil penelitian Wafa *et al.*, (2021), yang menyatakan bahwa penambahan antioksidan alami dalam pengencer semen dapat meningkatkan viabilitas dan integritas membran spermatozoa kerbau. Temuan

serupa juga dinyatakan oleh Selçuk dan Nizam (2019), yang menemukan bahwa vitamin E dan glutathion efektif dalam menjaga struktur membran serta meningkatkan motilitas sperma setelah proses *thawing*. Selain itu, penelitian oleh Semih Gungor *et al.* (2019) menyatakan bahwa kombinasi antioksidan dalam pengencer semen sapi jantan mampu mengurangi stres oksidatif dan memperkuat kestabilan membran, asalkan digunakan dalam dosis yang tepat agar tidak menimbulkan efek sebaliknya.

Namun, dengan semakin meningkatnya dosis β -karoten P2 (0,2% β -karoten) dan P3 (0,3% β -karoten), nilai MPU justru menurun menjadi 29,19 ± 0,74% dan 26,63 ± 2,11%. Penurunan ini mengindikasikan bahwa penggunaan β -karoten dalam dosis tinggi dapat berubah menjadi pro-oksidan, yang justru merusak membran sel akibat ketidakseimbangan redoks di dalam lingkungan sel. Hal ini didukung oleh Patel *et*

al., (2016), yang menjelaskan bahwa meskipun penambahan antioksidan seperti *cysteine HCl* dan asam askorbat dapat meningkatkan kualitas sperma, efek tersebut sangat bergantung pada dosis yang digunakan. Dosis berlebihan justru bisa menyebabkan kebocoran enzim dan merusak sel sperma.

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini konsisten dengan beberapa literatur lain, seperti tinjauan dari Raheja *et al.*, (2018), yang menyatakan bahwa kombinasi antara antioksidan dan protein stabilizer dalam pengencer semen dapat menjaga kualitas spermatozoa setelah *thawing*. MDPI (2021) dan EKBA (2023) juga menegaskan pentingnya penggunaan antioksidan dan krioprotektan dalam dosis yang tepat untuk menjaga stabilitas membran dan mengurangi stres

oksidatif. Oleh karena itu, kombinasi β -karoten 0,1% dan gliserol 2% dianggap sebagai formula yang paling efektif dalam menjaga MPU dan meningkatkan kualitas biologis semen beku kerbau lumpur.

Abnormalitas spermatozoa adalah indikasi penurunan kesuburan karena berfungsi mengurangi kapasitas spermatozoa pada saat fertilisasi dan mempengaruhi perkembangan dan pemeliharaan kebuntingan (Banaszewska & Andraszek 2021).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan β -karoten atau gliserol tidak memberikan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) terhadap abnormalitas semen beku kerbau lumpur (Tabel 4).

Tabel 4. Rataan Abnormalitas Semen Beku Kerbau Lumpur.

Perlakuan	Rata-rata
P0 (Trish KT + 0% β -Karoten + 0% Gliserol)	32,64±3,46
P1 (Trish KT + 0,1% β -Karoten)	29,50±4,07
P2 (Trish KT + 0,2% β -Karoten)	23,53±5,50
P3 (Trish KT + 0,3% β -Karoten)	29,89±2,51
P4 (Trish KT + 2% Gliserol)	25,17±0,40
P5 (Trish KT + 4% Gliserol)	27,65±0,98
P6 (Trish KT + 6% Gliserol)	26,12±1,51

Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan β -karoten dan gliserol dalam jumlah yang sesuai mampu menjaga bentuk dan struktur sperma selama proses pembekuan. β -karoten, yang dikenal sebagai antioksidan alami, membantu menetralkan radikal bebas yang berpotensi merusak membran dan organel sel. Sementara itu, gliserol berperan sebagai krioprotektan yang menjaga tekanan osmotik tetap stabil serta mencegah kerusakan akibat pembentukan kristal es selama pembekuan. Penelitian oleh Patel *et al.* (2016) mendukung hal ini, di mana mereka menemukan bahwa penambahan asam askorbat dan *cysteine* dalam pengencer semen mampu memperbaiki morfologi sperma kerbau setelah pencairan (*post-thawing*).

Penelitian terbaru oleh Younus *et al.*, (2024) juga mendukung temuan ini. Mereka menyatakan bahwa pemberian antioksidan seperti vitamin C, *ergothioneine*, dan *pyrroloquinoline quinone* (PQQ) secara signifikan dapat mengurangi stres oksidatif dan memperbaiki struktur morfologi spermatozoa sapi. Perlindungan terhadap mitokondria dan kepala sperma dinilai penting karena mampu mencegah kerusakan DNA dan deformasi bentuk sperma yang sering terjadi akibat proses pembekuan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan penambahan β -

karoten konsentrasi 0,1 %, 0,2%, 0,3% dibandingkan dengan penambahan Gliserol 2%, 4%, 6% pada pengencer tris kuning telur sama sama memberikan perbedaan nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas dan sama sama tidak memberikan perbedaan nyata ($P > 0,05$) terhadap viabilitas, membran plasma utuh dan abnormalitas semen beku kerbau lumpur. Penambahan β -karoten sampai 0,2% atau penambahan Gliserol sampai 4% mampu mempertahankan angka *post thawing motility* (PTM) di atas 40%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kepala Balai, staf laboratorium, dan staf lapangan Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato, Ibhuh, Payakumbuh, Sumatera Barat, yang telah memberikan kesempatan penelitian di laboratorium BIB Tuah Sakato, Payakumbuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Arientie, O.S., T.L. Yusuf, D. Sajauthi, dan R.I. Arifiantini. 2013. Pengaruh Krioprotektan Gliserol dan Dimethylformamida dalam Pembekuan Semen Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Pengencer Tris Modifikasi. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veterinary*.18(4): 239-250.
- Badan Standardisasi Nasional. (2021). *SNI 4869-2:2021 – Semen Beku Bagian 2: Kerbau (Bubalus bubalis)*.
- Banaszewska, Dorota, and Katarzyna Andraszek. 2021. "Assessment of the Morphometry of Heads of Normal Sperm and Sperm with the Dag Defect in the Semen of Duroc Boars." *Journal of Veterinary Research (Poland)* 65(2): 239–44. doi:10.2478/jvetres-2021-0019.
- Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan. (2023). *Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2023*. Kementerian Pertanian RI.
- EKBA Journal. (2023). Role of Antioxidants in Sperm Cryopreservation. *JAVS*.
- Eriani, A., Yusran, Y., Syafruddin, A., & Sari, D. R. (2018). *Effect of β -carotene on sperm quality of Aceh swamp buffalo after thawing*. *Tropical Animal Science Journal*, 41(3), 157–165.
- Ervandi, M., T. Susilawati dan S. Wahjuningsih. 2013. Pengaruh Pengencer yang Berbeda Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Hasil Sexing dengan Gradien Albumin (Putih Telur). *JITV* 18(3): 177-184.
- Fafandri, M. I., Santoso, R., & Saputra, W. T. (2023). Kualitas Semen Beku Sapi Bali Pasca *Thawing* dalam Waktu Berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 10(1), 60–66.
- Genc, H., Kaya, A., & Tekin, K. (2023). Role of β -carotene supplementation on semen quality and oxidative stress in livestock reproduction. *Veterinary Research Communications*, 47(2), 345–353.
- Genesti, E., Elisia, R. E., & Maiyontoni. (2024). *Jurnal Review: Inseminasi Buatan (Ib) Peningkatan Kelahiran Ternak Dan Pendapatan Usaha Ternak*. *Jurnal Tropicalanimal*, 2(2).
- Gharagozloo, P., & Aitken, R. (2011). The role of reactive oxygen species in male infertility. *Human Reproduction*.
- Goyal, R.L., R.K. Tuli, G.C. Georgie, and D. Chand. 1996. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing or sephadex filtration. *Theriogenology* 46:679-686.
- Gunawan, A., Suryadi, D., & Rahmadani, D. (2023). *Optimalisasi penggunaan gliserol dalam pengenceran semen kerbau: studi review*. *Jurnal Ilmu Ternak Indonesia*, 25(1), 33–40.
- Gungor, S., Bucak, M. N., & Atessahin, A. (2019). The effects of different glycerol concentrations on post-thaw sperm quality in buffalo. *Theriogenology*, 135, 67–73.

- Isnaini. 2020. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Kerbau. Malang: UB Press, Malang.
- Khalil, W. A., El-Deghaidy, R. M., Sakr, A. M., Swelum, A. A., Abdelnour, S. A., & El-Harairy, M. A. (2025). Impacts of adding sucrose or trehalose to extenders with different glycerol concentrations on freezability and fertility of buffalo bull semen. *Veterinary Research Communications*, 49, Article 22.
- Kumar, D., et al (2016). *Relationship of Post-Thaw Sperm Motility and Kinematics with Conception Rate in Buffaloes*. *Veterinary World*, 9(7), 678-683.
- Manehat, F. X., A. A. Dethan, dan P. K. Tahuk. 2021. Motilitas, viabilitas, abnormalitas spermatozoa dan pH semen sapi bali dalam pengencer sari air tebu-kuning telur yang disimpan dalam waktu yang berbeda. *Journal of Tropical Animal Science and Technology*. 3(2):76-90.
- Manehat, L., Rasyid, A., & Purnomo, B. (2021). *Viabilitas spermatozoa setelah pembekuan pada beberapa jenis pengencer dan krioprotektan*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 26(2), 112–120.
- MDPI. (2021). Review: Cryopreservation Strategies in Livestock. *Animals*, 12(23), 3271.
- Patel, H. A., Siddiquee, G. M., Chaudhari, D. V., & Suthar, V. S. (2016). Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability of buffalo semen. *Veterinary World*, 9(3), 299–303. Press. Malang.
- Prakash, M., Sinha, M. P., & Yadav, A. K. (2022). Dual role of β -carotene in sperm cryopreservation: Antioxidant versus pro-oxidant effects. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(6), 735–741.
- Purwantara, B., Arifiantini, R. I., Said, S., & Rahayu, J. D. (2024). Uji Integritas Membran Plasma Sperma Menggunakan Dua Metode yang Berbeda pada Semen Beku Kerbau Murrah. *Institut Pertanian Bogor (IPB)*.
- Putra, E., Khaeruddin, K., Armayanti, A. K., Farida, S., & Amin, S. (2022). Kualitas Spermatozoa Sapi Peranakan Limousin dalam Pengencer AdroMed yang Ditambahkan Berbagai Level Glukosa. *Musamus Journal of Livestock Science*, 5(1), 6-15.
- Raheja, K., et al. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *ResearchGate*.
- Rattan, P.J.S. 1990. Physico-chemical constituents of buffalo bull semen. Proc. of the II World Buffalo Congress, New Delhi. p. 26-30.
- Savitri, F.K., Sri S. & Siswanto. 2014. Kualitas Semen Beku Sapi Bali Dengan Penambahan Berbagai Dosis Vitamin C Pada Bahan Pengencer Skim Kuning Telur. P:30-36.
- Siahaan, E.A., D.N.D.I. Laksmi & W. Bebas. 2012. Efektifitas Penambahan Berbagai Konsentrasi B-Karoten Terhadap Motilitas Dan Daya Hidup Spermatozoa Sapi Bali Post Thawing. *Indonesia Medicus Veterinus*. Vol.1(2): 239-251.
- Singh, L., Chauhan, M. S., & Nagpal, R. (2019). Optimization of glycerol levels for buffalo semen cryopreservation. *Asian Journal of Animal Science*.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. Universitas Brawijaya Press (UB Press). Malang. 176 hal.
- Verma, S. A. L., Prasad, J. K., Ghosh, S. K., Das, G. K., Balamurugan, B., & Verma, M. R. (2018). *Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation*. *Andrologia*, e12970.
- Younus, A. M. D., Yamanaka, T., & Shimada, M. (2024). The protective effects of antioxidants against oxidative stress on bull sperm. *In Vitro Cellular &*

Developmental Biology – Animal, 60, 969–
982.