

Efek Penambahan Antioksidan Selenium, Kurkumin dan Kombinasinya Terhadap Motilitas, Recovery Rate dan Viabilitas Spermatozoa pada Kriopreservasi Semen Sapi Peranakan Ongole

The Effect of Supplementation Antioxidant Selenium, Curcumin and Their Combination on Motility, Recovery Rate and Viability Spermatozoa in Semen Cryopreservation Ongole Crossbreed Bull

Resa Miftahatu Yuniar¹, Asmarani Kusumawati^{2*}, Erif Maha Nugraha Setyawan²

¹Magister Sains Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

²Departemen Reproduksi dan Obstetri, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author; Email: uma_vet@ugm.ac.id

Naskah diterima: 5 Juni 2023, revisi: 15 Januari 2024, diterima: 6 November 2024

Abstract

One of the obstacles in implementing semen cryopreservation is the high concentration of reactive oxygen species (ROS), which cause a reduction in sperm motility and post thawing sperm viability. The strategy to decrease high levels of ROS is adding antioxidant to the diluent during the cryopreservation process. This research aims to determine the effect of adding the antioxidants selenium and curcumin in reducing oxidative stress in the semen cryopreservation process of PO cattle. This research used semen from PO cattle that is collected by an artificial vagina. The collected semen samples were examined microscopically and macroscopically and then divided into four treatments there are control, addition of 50 μM selenium (sodium selenite), 10 μM curcumin and combination between 50 μM selenium & 10 μM curcumin. Semen that has been mixed with diluent and antioxidant then followed by the freezing process of cryopreservation. Furthermore, parameters observed included sperm motility, recovery rate and sperm viability. All parameters were analyzed by SPSS with One Way ANOVA and DMRT test. The result of this research showed that the treatment of 10 μM curcumin has motility of $48.00 \pm 4.47\%$, recovery rate of $66.66 \pm 5.54\%$, viability of $67.00 \pm 4.30\%$. In contrast, the treatment of 50 μM selenium has a percentage value of motility $46.00 \pm 4.18\%$, recovery rate $63.90 \pm 5.59\%$ and viability of $64.00 \pm 3.93\%$. Utilization of the combination showed that it did not have give a significant effect compared to the control. This study concludes that adding the antioxidants curcumin and selenium is beneficial for maintaining sperm quality in PO cattle semen. Still, the combination treatment is not effective at preserving sperm quality.

Keywords: curcumin; cryopreservation; selenium; PO Cattle; oxidative stress.

Abstrak

Salah satu kendala dalam pelaksanaan kriopreservasi semen adalah tingginya kadar *reactive oxygen species* (ROS) yang dapat menyebabkan reduksi pada motilitas sperma dan viabilitas sperma *post thawing*. Strategi untuk mengatasi tingginya kadar ROS adalah dengan menambahkan antioksidan pada pengencer selama proses kriopreservasi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan antioksidan selenium dan kurkumin dalam menurunkan stress oksidatif pada proses kriopreservasi semen sapi peranakan ongole (PO). Penelitian ini menggunakan semen yang dikoleksi dari sapi PO dengan vagina buatan. Sampel semen yang ditampung diperiksa secara mikroskopis dan makroskopis kemudian dibagi menjadi 4 perlakuan yaitu kontrol, penambahan selenium (*sodium selenite*) dengan konsentrasi 50 μM , kurkumin 10 μM dan kombinasi antara

selenium 50 μM dengan kurkumin 10 μM . Semen yang telah dicampur dengan pengencer dan antioksidan kemudian dibekukan dalam proses kriopreservasi, selanjutnya parameter yang diamati meliputi pemeriksaan motilitas sperma, *recovery rate* dan viabilitas sperma. Semua parameter dianalisis statistika menggunakan *One Way ANNOVA* dan uji DMRT. Berdasarkan penelitian menunjukkan bahwa perlakuan kurkumin 10 μM memiliki nilai motilitas $48.00 \pm 4.47\%$, *recovery rate* $66.66 \pm 5.54\%$ dan viabilitas $67.00 \pm 4.30\%$, sedangkan perlakuan selenium 50 μM memiliki nilai presentase motilitas $46,00 \pm 4,18\%$, *recovery rate* $63.90 \pm 5.59\%$ dan viabilitas $64.00 \pm 3.93\%$. Pemanfaatan kombinasi kurkumin dan selenium tidak memberikan pengaruh yang nyata dibandingkan dengan kontrol. Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan antioksidan kurkumin dan selenium bermanfaat dalam mempertahankan kualitas sperma sapi PO, namun perlakuan kombinasi kurang baik dalam mempertahankan kualitas sperma.

Kata kunci: kurkumin; kriopreservasi; selenium; sapi PO; stress oksidatif

Pendahuluan

Kualitas genetik sapi Peranakan Ongole (PO) dapat dipertahankan dengan metode kriopreservasi, yaitu suatu teknik dalam menyimpan gamet sapi PO yang berkualitas unggul dalam kondisi beku dengan tujuan untuk melakukan reduksi aktivitas metabolisme dengan tetap menjaga fungsi dari organel-organel di dalam sel (Gazali dan Tambing, 2002). Metode kriopreservasi semen berpotensi untuk konservasi *in situ* dan mempercepat penyebaran genetik (Kostaman dan Setioko, 2011), namun penerapan metode kriopreservasi semen yang dikembangkan saat ini ternyata belum mencapai tingkat keberhasilan yang diharapkan karena masih banyak spermatozoa yang mengalami kerusakan setelah kriopreservasi (Khan *et al.*, 2021). Efek negatif dari kriopreservasi yaitu adanya stress oksidatif yang disebabkan oleh tingginya kadar *reactive oxygen species* (ROS) (Ball 2008). Hal tersebut memberikan efek negatif terhadap sperma karena dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada membran, denaturasi protein, memberikan efek reduksi pada motilitas sperma dan viabilitas sperma *post thawing* (Karakus *et al.*, 2021).

Strategi untuk mengatasi tingginya kadar ROS adalah dengan menambahkan antioksidan pada pengencer selama proses kriopreservasi (Sariözkan *et al.*, 2010). Beberapa antioksidan yang dapat digunakan untuk melindungi sperma adalah selenium dan kurkumin. Jamali *et al.* (2019) menyatakan bahwa suplementasi selenium dengan konsentrasi 2mM/ml pada semen yang dikriopreservasi dapat meningkatkan motilitas sperma *post thawing*, sementara Tvrdá *et al.* (2016) menyampaikan jika suplementasi

antioksidan kurkumin dengan dosis 25-50 μM dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa pada semen sapi yang dikriopreservasi selama 24 jam. Penambahan antioksidan selenium dan kurkumin di media pembekuan terbukti dapat menurunkan adanya ROS, mengurangi adanya peroksidasi lipid, dapat mempertahankan viabilitas, mempertahankan motilitas, mempertahankan fungsi membran dan tingkat fertilitas sperma (Len *et al.*, 2019; Masoudi *et al.*, 2020).

Berdasarkan latar belakang tersebut, efek negatif yang dihasilkan dari proses kriopreservasi dapat diatasi dengan dilakukan penelitian tentang penambahan kurkumin, selenium, dan kombinasi antara kurkumin dengan selenium. Penelitian ini bertujuan untuk melihat adanya pengaruh antioksidan yang disuplementasikan selama proses pembekuan semen secara kriopreservasi terhadap kualitas spermatozoa sapi PO *post-thawing*. Penelitian ini juga nantinya dapat digunakan sebagai referensi yang dapat digunakan untuk kriopreservasi sapi PO unggul di Indonesia.

Materi dan Metode

Ethical Clearance

Penelitian ini telah disetujui dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk penelitian menggunakan hewan oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, dengan nomor: 0113/EC-FKH/Int./2022.

Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan semen yang dikoleksi dari 5 sapi PO yang dipelihara di Balai Inseminasi Buatan Lembang (BIB Lembang)

dengan rentang usia 7-9 tahun yang memiliki berat badan 660-795 kg. Semen yang digunakan sesuai dengan standar dari *Indonesian National Standardization* (SNI) nomor 4869.1: 2017 yaitu berasal dari pejantan unggul yang memiliki kemampuan reproduksi yang baik dan telah diseleksi dari garis keturunannya. Sapi PO yang digunakan juga harus dalam kondisi sehat dan terbebas dari penyakit menular. Bahan-bahan untuk pembuatan larutan pengencer adalah kuning telur, antibiotik penisilin (Meiji, Indonesia), antibiotik streptomisin (Meiji, Indonesia), aquabidest, glukosa, gliserol, kertas saring, *aluminium foil*. Antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah selenium (*sodium selenite*) (Merck, German) dan kurkumin (dilarutkan dengan menggunakan DMSO) (Merck, German).

Beberapa bahan tambahan yang diperlukan untuk pemeriksaan spermatozoa antara lain kertas pH, fruktosa, sodium sitrat 3%, NaCl fisiologis (Widatra Bhakti, Indonesia), *eosin nigrosine*. Penelitian ini menggunakan beberapa alat diantaranya adalah vagina buatan (Minitub, German), *object glass*, *cover glass*, *slide warmer* (Minitub, German), tabung untuk koleksi sperma, mikroskop (Olympus, Jepang) dengan kamera (Opti Lab, Indonesia), *thermometer*, gelas ukur, mikropipet, microtip (Biologix, China), spuit, microtube, tabung konikel, straw, erlenmeyer, pengaduk, sendok tanduk, timbangan digital (Ohaus Corporation, USA), waterbath, refrigerator, *cool top* (Minitub, German), *straw printing machine* (Minitub, German), *filling sealing machine* (Minitub, German), *freezing machine* (Minitub, German), bunsen, korek api, *container storage*, *straw* dan *cutter straw*.

Metode Penelitian

Perlakuan dalam penelitian ini dibagi menjadi empat yaitu kontrol, penambahan antioksidan selenium 50 µM, penambahan antioksidan kurkumin 10 µM dan kombinasi selenium 50 µM + kurkumin 10 µM. Rangkaian penelitian meliputi persiapan bahan pengencer, koleksi dan pemeriksaan semen segar, pengenceran dan pembekuan semen, pencairan kembali/*thawing*, dan pemeriksaan kualitas spermatozoa.

Prosedur Penelitian

Semen segar yang telah dikoleksi dengan vagina buatan, kemudian dilakukan uji secara makroskopis untuk melihat jumlah volume, bau, warna pada semen segar, konsistensi dan pH semen segar. Pemeriksaan selanjutnya yaitu pemeriksaan secara mikroskopis untuk melihat gerakan massa, motilitas sperma, dilanjutkan dengan menghitung daya hidup atau viabilitas sperma. Semen yang memenuhi standar minimum kemudian dilanjutkan dengan tahapan kriopreservasi.

Pengenceran dan Pembekuan Semen

Standar minimum untuk kualitas spermatozoa yang digunakan dalam penelitian ini adalah memiliki motilitas tidak dibawah 65%, memiliki gerakan massa sangat baik (+++), memiliki abnormalitas <20% dan konsentrasi spermatozoa tidak kurang dari 100 juta spermatozoa per milimeter dengan 60-75 mililiter per ejakulasi (Susilawati, 2011). Semen segar yang telah memenuhi syarat kemudian dicampur dengan larutan pengencer. Penentuan volume pengencer sesuai dengan rumus (Telnoni *et al.*, 2017):

$$\text{Volume total (Vt)} = \frac{\text{volume semen (ml)} \times \text{konsentrasi} \times \text{motilitas (\%)}}{\frac{25.0000}{0,25} \text{CC}}$$

Semen yang telah memenuhi syarat tersebut kemudian dilanjutkan dengan proses pengenceran. Proses penambahan larutan pengencer pada penelitian ini dilakukan dengan metode satu tahap yaitu penambahan larutan pengencer yang telah ditambahkan dengan gliserol pada saat suhu semen 37°C, setelah itu semen yang telah dicampur dengan larutan pengencer diletakkan pada *cool top* yang memiliki suhu 4-5 °C. Proses *filling* dan *sealing* dilakukan dengan menggunakan mesin *filling sealing machine* yang ditempatkan pada *cool top* bersuhu 3-5°C. Tahapan berikutnya adalah *pre freezing* yaitu menata *straw* pada rak khusus, kemudian dimasukkan pada *container processing* yang berisi nitrogen dengan jarak 2 cm yang bersuhu -150°C selama 9 menit, setelah itu dilanjutkan dengan tahapan yang terakhir yaitu dengan mencelupkan *straw* ke dalam nitrogen cair. Semen beku yang disimpan

selama 24 jam dilakukan *thawing* dengan suhu 37°C selama 15 detik.

Pemeriksaan Makroskopis Semen

Volume: semen yang telah dikoleksi kemudian dilakukan pemeriksaan volume (ml) dengan gelas ukur.

Bau: pemeriksaan ini dilakukan dengan mencium bau semen secara langsung dari tabung penampungan. Semen yang normal akan menghasilkan bau semen khas semen sapi, sedangkan pada sapi yang mengalami infeksi pada saluran reproduksi akan memiliki bau busuk karena terdapat nanah di dalamnya.

Warna: dilakukan pengamatan secara langsung pada semen yang telah diletakkan pada tabung penampung. Sapi yang memiliki semen normal ditandai dengan warna putih yang mirip dengan warna susu, sedangkan semen yang abnormal akan memiliki warna merah (kontaminasi dengan darah), hijau (terdapat bakteri pembusuk) dan cokelat (kontaminasi darah yang telah mengalami dekomposisi).

Konsistensi: pemeriksaan konsistensi semen dilakukan dengan cara memiringkan tabung penampung ke arah kiri dan kanan, kemudian melakukan pengamatan pada gerakan semen, jika gerakan perpindahan cairan semen lambat maka menunjukkan bahwa konsistensi semen tersebut adalah kental dan begitupun sebaliknya.

pH: digunakan kertas indikator pH untuk mengukur kadar pH pada semen segar, pemeriksaan dilakukan dengan mencelupkan kertas tersebut pada semen, kemudian kertas tersebut akan berubah warna sesuai dengan pH semen.

Pemeriksaan Mikroskopis Semen

Gerakan Massa: semen sebanyak 10 µL diteteskan pada *object glass* yang telah dihangatkan di atas *slide warmers*, setelah itu dilakukan pengamatan gerakan massa dengan mikroskop menggunakan perbesaran 100 kali pada lensa objektif. Penilaian gerakan massa dinilai berdasarkan adanya gelombang yang dibuat oleh spermatozoa. Kriteria penilaian gerak massa berdasarkan Susilawati (2011) adalah sebagai berikut:

1. Sangat baik (+++): gerakan massa yang ditunjukkan dengan adanya gelombang yang besar, gelombang berwarna gelap, gelombang yang terbentuk tebal dan terdapat gumpalan seperti awan hitam yang bergerak secara cepat.
2. Baik (++) : gerakan massa yang ditunjukkan dengan terbentuknya gelombang-gelombang yang kecil tipis, gelombang yang terbentuk jarang, serta memiliki pergerakan gelombang yang lamban.
3. Kurang baik (+): pada kategori ini tidak ada gelombang yang terbentuk, ditunjukkan dengan adanya gerakan individu yang progresif.
4. Buruk (0): tidak terlihat adanya gelombang yang terbentuk, namun terlihat sedikit adanya gerakan-gerakan individual.

Motilitas Spermatozoa

Semen sebanyak 10 µl diteteskan pada *object glass* yang sudah dihangatkan, setelah itu diteteskan 40 µl larutan *saline* lalu ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan motilitas dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 100 kali pada lensa objektif. Penentuan penilaian motilitas dilakukan dengan membandingkan spermatozoa yang bergerak progresif dengan yang tidak progresif, nilai motilitas dinyatakan dalam presentase (%) dengan skala 0-100%.

Recovery Rate

Recovery rate (RR) adalah sebuah indikator yang menunjukkan keberhasilan proses kriopreservasi. Penilaian nilai RR dilakukan dengan rumus:

$$RR = \frac{\text{persentase motilitas semen beku post thawing}}{\text{persentase motilitas semen segar}} \times 100\%$$

Viabilitas dan Abnormalitas Spermatozoa

Prosedur yang dilakukan adalah dengan mencampur 10 µL semen cair dengan 50 µL cat *eosin-nigrosin*, setelah itu dihomogenkan dan ditunggu selama 15 detik, kemudian dilakukan pembuatan preparat apusan dengan ulas tipis pada *object glass*, preparat yang telah dibuat difiksasi dengan api di atas bunsen, kemudian diamati dengan mikroskop pembesaran 400 kali pada lensa objektif. Spermatozoa yang hidup

menunjukkan warna putih pada bagian kepala sedangkan spermatozoa yang mati kepalanya akan berwarna merah, kemudian diamati abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder spermatozoa (Aldini *et al.*, 2022).

Analisis Data

Analisis data dengan SPSS melalui uji *One-Way ANOVA*, untuk melihat perbedaan nyata antar perlakuan dilakukan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

Hasil dan Pembahasan

Kualitas Semen Segar Sapi PO

Semen segar pada penelitian ini telah memenuhi persyaratan untuk dilanjutkan proses *freezing* (Tabel 1). Semen yang dikoleksi memiliki rata-rata volume sebesar $5,71 \pm 1,72$ ml. Garner dan Hafez (2000) melaporkan jika rata-rata volume semen sapi berkisar 5-8 ml per ejakulasi. Nugraha *et al* (2021) dalam penelitiannya melaporkan bahwa rata-rata volume ejakulasi semen segar pada sapi PO berkisar antara 0,6-6,43 ml. Jumlah volume semen dapat dipengaruhi oleh perbedaan genetik, ukuran testis, umur, dan berat badan (Susilawati *et al.*, 2020; Nugraha *et al.*, 2021).

Nilai pH pada semen segar adalah $6,52 \pm 0,12$ yang menunjukkan bahwa semen segar pada penelitian ini termasuk kategori normal. Sesuai dengan Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa semen sapi PO dapat dikategorikan normal jika memiliki pH dengan kisaran $6,4 \pm 7,8$. pH merupakan sebuah indikator yang dapat mempengaruhi daya tahan spermatozoa untuk hidup (Donoghue

dan Wishart, 2000). Nilai pH juga memiliki peranan penting terhadap spermatozoa terutama berkaitan dengan motilitas, viabilitas, kapasitas dan reaksi akrosom (Mishra *et al.*, 2018).

Berdasarkan uji makroskopis, semen sapi PO memiliki warna putih krem, hal tersebut sesuai dengan Cenariu *et al* (2018) yang melaporkan bahwa semen yang normal berwarna putih krem. Warna semen dengan kekentalan semen dapat menjadi indikator untuk menginterpretasikan tinggi rendahnya konsentrasi spermatozoa (Junaedi *et al.*, 2016), semakin tinggi konsentrasi semen maka dapat menunjukkan adanya konsistensi dan kepekatan warna semen yang meningkat, sedangkan semen yang berwarna pucat menunjukkan bahwa semen memiliki konsentrasi yang rendah serta memiliki kekentalan semen yang dikategorikan encer (Sutama *et al.*, 2000).

Pemeriksaan selanjutnya adalah pemeriksaan secara mikroskopis dengan melihat gerakan massa. Gerakan massa pada penelitian ini menunjukkan bahwa gerakan massa semen sapi PO termasuk kategori baik (++) . Gerakan massa dapat menunjukkan adanya gerakan individu spermatozoa, spermatozoa yang bergerak secara progresif dapat menginterpretasikan semen yang digunakan dalam penelitian memiliki kualitas semen yang baik (Junaedi *et al.*, 2016).

Uji mikroskopis berikutnya adalah melihat motilitas individu spermatozoa, nilai motilitas semen segar pada penelitian ini yaitu $72,00 \pm 2,73$. Standar motilitas spermatozoa berdasarkan *Indonesian National Standardization* (SNI) nomor 4869.1:2017 yaitu memiliki nilai motilitas semen segar sebesar 70%, sedangkan nilai motilitas untuk semen beku adalah 40%. Semen segar yang memiliki motilitas sebesar 70% dapat diproses menjadi semen beku (Sarastina *et al.*, 2007). Motilitas spermatozoa berperan dalam menentukan kemampuan sperma dalam fertilisasi, sehingga motilitas menjadi indikator yang sangat penting (Ratnawati *et al.*, 2018).

Nilai konsentrasi spermatozoa pada penelitian ini adalah sebesar $1239 \pm 148,7$ ($\times 10^9$ /ml). Konsentrasi menjadi salah satu aspek penting karena dapat menunjukkan fertilitas pada pejantan, serta dapat menjadi acuan untuk penambahan banyaknya jumlah pengencer yang akan digunakan untuk kriopreservasi (Cenariu

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi PO

Karakteristik Semen	Rata-rata \pm SD
Makroskopis	
Volume (ml)	$5,71 \pm 1,72$
pH	$6,52 \pm 0,12$
Warna	Putih krem
Mikroskopis	
Gerakan massa	++
Motilitas spermatozoa (%)	$72,00 \pm 2,73$
Konsentrasi spermatozoa ($\times 10^9$ /ml)	$1239 \pm 148,7$
Viabilitas	$83,00 \pm 2,73$
Abnormalitas	$1,80 \pm 1,30$

SD: standart deviation

et al., 2018). Viabilitas semen segar pada penelitian ini adalah sebesar $83,00 \pm 2,73$. Nilai tersebut selaras dengan penelitian Nugraha *et al* (2021) yang menunjukkan nilai viabilitas pada semen segar sapi PO berkisar antara 71,82-83,66%.

Semen segar pada penelitian ini memiliki nilai abnormalitas sebesar $1,80 \pm 1,30$. Rata-rata nilai abnormalitas pada semen segar sapi PO berkisar antara 1,15-2,99% (Nugraha *et al.*, 2021). Spermatozoa yang dapat diproses untuk tahapan kriopreservasi jika memiliki jumlah morfologi sperma yang normal sebesar 65-95% (Garner dan Hafez, 2000). Semen segar yang telah dievaluasi dengan uji makroskopis dan mikroskopis pada penelitian ini dapat diproses untuk semen beku.

Pengaruh Kurkumin, Selenium dan Kombinasinya Terhadap Motilitas Semen Sapi PO

Persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan penambahan antioksidan kurkumin 10 μM , selenium 50 μM dan kombinasi berbeda nyata dengan perlakuan kontrol yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi $P < 0,05$. Nilai rata-rata pada perlakuan penambahan antioksidan kurkumin 10 μM yaitu $48,00 \pm 4,47$ lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa *post thawing* dibandingkan dengan perlakuan kontrol ($40,00 \pm 3,53$) (Tabel 2).

Hasil ini sejalan dengan temuan Tvrdá *et al* (2016) yang melaporkan bahwa penambahan antioksidan kurkumin dengan dosis 10 μM pada semen sapi perah Friesian Holstein (FH) dapat meningkatkan motilitas sperma lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Nilai motilitas pada perlakuan kontrol menunjukkan hasil yang rendah karena penambahan krioprotektan gliserol pada larutan pengencer belum mampu untuk melindungi sel dari adanya radikal bebas, Gliserol hanya berfungsi dalam melindungi sel

dari kristal es yang terbentuk selama proses kriopreservasi berlangsung (Whaley *et al.*, 2021).

Tingginya kadar ROS selama proses kriopreservasi menyebabkan terjadinya kerusakan pada mitokondria yang berpengaruh terhadap produksi ATP, sehingga hal tersebut menyebabkan motilitas sperma mengalami penurunan (Gallo *et al.*, 2021). Penambahan antioksidan kurkumin dalam media pengenceran selama proses kriopreservasi dapat berfungsi dalam mengurangi adanya radikal bebas yang menyebabkan stress oksidatif (Santonastaso *et al.*, 2021). Kurkumin mencegah terjadinya peroksidasi lipid melalui aktivasi enzim *glutathione peroxidase*, *catalase* dan enzim *dismutase* (Karakus *et al.*, 2021). Enzim tersebut berperan dalam mengkatalisis toksik H_2O_2 dan hidroperoksida (Masoudi *et al.*, 2020).

Rataan nilai pada motilitas *post thawing* dengan penambahan antioksidan selenium 50 μM ($46,00 \pm 4,118$) lebih tinggi daripada motilitas spermatozoa pada perlakuan kontrol ($40,00 \pm 3,53$). Dorostkar *et al* (2014) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa penambahan antioksidan selenium dalam bentuk sodium selenite dengan dosis 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ yang menggunakan tris kuning telur dapat mempertahankan motilitas semen kerbau lebih baik dibandingkan dengan kontrol. Sodium selenite berperan dalam menurunkan stress oksidatif melalui aktivasi selenoprotein *Phospholipid Hydro-peroxide Glutathione Peroxidase* (Martins *et al.*, 2014; Rahimi *et al.*, 2023). Sodium selenite juga berfungsi sebagai kofaktor *glutathione peroksidasi* yang diketahui dapat mengkatalis pengurangan toksik H_2O_2 dan hidroperoksidasi (Ahsan *et al.*, 2014).

Rata-rata motilitas pada perlakuan kontrol atau tanpa penambahan antioksidan menunjukkan hasil yang lebih tinggi ($40,00 \pm 3,53$) jika dibandingkan dengan perlakuan

Tabel 2. Kualitas semen beku sapi PO dengan penambahan antioksidan kurkumin, selenium, dan kombinasinya setelah kriopreservasi

Parameter	Kontrol	Kurkumin	Selenium	Kombinasi
Motilitas	$40,00 \pm 3,53^a$	$48,00 \pm 4,47^{bc}$	$46,00 \pm 4,118^c$	$34,00 \pm 2,23^d$
Recovery rate	$55,52 \pm 3,89^a$	$66,66 \pm 5,54^{bc}$	$63,90 \pm 5,59^c$	$47,24 \pm 2,96^d$
Viabilitas	$56,00 \pm 4,00^a$	$67,00 \pm 4,30^{bc}$	$64,00 \pm 3,93^c$	$48,20 \pm 3,89^d$

^{a,b,c,d} Huruf yang berbeda pada baris yang sama mengindikasikan perbedaan nyata $P < 0,05$.

penambahan kombinasi antioksidan kurkumin 10 μM dan selenium 50 μM ($34,00 \pm 2,23$). Antioksidan yang ditambahkan dalam jumlah banyak pada pengencer diduga dapat meningkatkan laju tekanan osmotik, hal tersebut dapat berakibat buruk terhadap metabolisme spermatozoa terutama dalam produksi ATP, sehingga dapat menurunkan motilitas sperma (Solihati *et al.*, 2020). Antioksidan dalam jumlah yang tinggi dapat menyebabkan membran sperma mengalami hiperpolarisasi yang dapat membuat motilitas sperma terganggu (Naz, 2014).

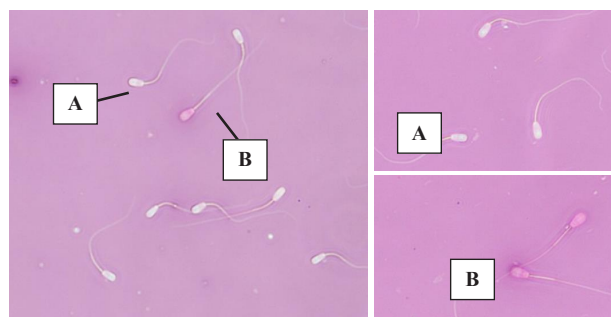
Pengaruh Kurkumin, Selenium dan Kombinasinya Terhadap *Recovery rate* Semen Sapi PO

Recovery rate semen beku dengan penambahan antioksidan kurkumin, selenium, dan kombinasinya menunjukkan adanya perbedaan nilai yang signifikan ($P < 0,05$) (Tabel 2). *Recovery rate* dihubungkan dengan kemampuan sperma untuk pulih setelah sperma dibekukan (Telnoni *et al.*, 2016). Nilai *recovery rate* dengan perlakuan penambahan antioksidan kurkumin 10 μM ($66,66 \pm 5,54$) dan selenium 50 μM ($63,90 \pm 5,59$) menunjukkan hasil yang lebih baik dibanding kontrol ($55,52 \pm 3,89$). Hal tersebut menunjukkan bahwa pemulihan integritas dan permeabilitas terjadi dengan cepat serta lebih efisien dalam biosintesis *adenosine triphosphate* (ATP) di axonema (Calamera *et al.*, 2010), ATP berperan penting untuk spermatozoa dapat bergerak dengan bebas (Nofa *et al.*, 2018). *Recovery rate* dapat digunakan untuk melihat kemampuan pengencer dan krioprotektan dalam menjaga keberlangsungan hidup sperma selama kriopreservasi (Telnoni *et al.*, 2016).

Pengaruh Kurkumin, Selenium dan Kombinasinya Terhadap Viabilitas Semen Sapi PO

Viabilitas spermatozoa pada kriopreservasi semen PO dengan penambahan antioksidan selenium, kurkumin, dan kombinasinya dapat dilihat pada Tabel 2. Nilai viabilitas spermatozoa setelah *thawing* dalam pengencer dengan penambahan antioksidan kurkumin, selenium dan kombinasinya berbeda nyata dengan

perlakuan tanpa penambahan antioksidan. Hal tersebut ditunjukkan dengan $P < 0,05$ yang dapat dilihat pada Tabel 2. Viabilitas spermatozoa pada kriopreservasi semen PO menunjukkan bahwa perlakuan penambahan antioksidan kurkumin dengan dosis 10 μM ($67,00 \pm 4,30$) dapat mempertahankan viabilitas sperma *post thawing* dibandingkan dengan kontrol ($56,00 \pm 4,00$). Abdnour *et al.* (2020) melaporkan bahwa pemberian antioksidan kurkumin pada semen kelinci yang disimpan pada nitrogen cair dengan suhu -196°C selama satu bulan dapat mempertahankan viabilitas sperma yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Antioksidan kurkumin dengan dosis 10 μM dapat menjaga viabilitas sperma lebih baik dibandingkan dengan kontrol (Tvrdá *et al.*, 2015).



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa dengan metode pengecatan eosin nigrosin, gambar (A) menunjukkan spermatozoa yang hidup/kepala tidak terwarnai (putih) (B) menunjukkan spermatozoa yang mati/kepala terwarnai merah

Rataan nilai viabilitas pada perlakuan penambahan antioksidan selenium dengan dosis 50 μM ($64,00 \pm 3,93$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa antioksidan ($56,00 \pm 4,00$). Penambahan sodium selenite pada media pengencer diketahui dapat meningkatkan viabilitas sperma dibandingkan dengan kontrol (Dorostkar *et al.*, 2014). Penelitian lain menyebutkan bahwa semen sapi yang disimpan pada suhu -196°C dengan penambahan selenium konsentrasi 0,5 $\mu\text{g/ml}$ dan 1 $\mu\text{g/ml}$ dapat mempertahankan motilitas, memiliki viabilitas yang lebih baik dan memiliki spermatozoa dengan integritas membran yang lebih baik dibandingkan dengan penyimpanan semen beku tanpa penambahan selenium (Khalil *et al.*, 2019).

Rata-rata viabilitas pada perlakuan kontrol atau tanpa penambahan antioksidan memiliki hasil yang lebih tinggi ($56,00 \pm 4,00$) dibandingkan dengan perlakuan penambahan kombinasi antioksidan kurkumin $10 \mu\text{M}$ dan selenium $50 \mu\text{M}$ ($48,20 \pm 3,89$). Pemberian antioksidan yang dilakukan secara berlebihan dapat menimbulkan ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas yang ada di dalam metabolisme sel, oleh sebab itu perlakuan kombinasi antara antioksidan selenium dan kurkumin kurang efektif dalam meningkatkan kualitas sperma beku sapi PO dibandingkan kontrol (Solihati *et al.*, 2020). Membran plasma spermatozoa sangat sensitif terhadap perubahan temperatur (Tethool *et al.*, 2022), sehingga larutan pengencer yang berbahan dasar skim milk kuning telur dapat berfungsi melindungi membran plasma dari efek *cold shock* selama proses kriopreservasi (Nofa *et al.*, 2018). Komponen fosfolipid yang terdapat pada susu skim dan kuning telur dapat menggantikan fosfolipid pada membran yang rusak selama proses pembekuan (Nofa *et al.*, 2018).

Kesimpulan

Antioksidan Kurkumin $10 \mu\text{M}$ dan selenium $50 \mu\text{M}$ dapat meningkatkan kualitas semen beku sapi PO yang disimpan dengan suhu -196°C yang meliputi motilitas, *recovery rate* dan viabilitas. Penelitian ini memberikan dasar untuk pengembangan metode kriopreservasi yang lebih efektif untuk semen sapi PO di Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Balai Inseminasi Buatan Lembang (BIB Lembang), Laboratorium Bioteknologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan UGM.

Daftar Pustaka

Abdnour, Sameh A., Mahmoud A. E. Hassan, Amer K. Mohammed, Ahmad R. Alhimaidi, Naif Al-Gabri, Khalid O. Al-Khaldi, and Ayman A. Swelum. 2020. The Effect of Adding Different Levels

of Curcumin and Its Nanoparticles to Extender on Post-Thaw Quality of Cryopreserved Rabbit Sperm. *Animals* 10(9):1–13. doi: 10.3390/ani10091508.

- Abe, Yasuyuki, Tomoyoshi Asano, Ichiko Wakasa, Aiko Kume, Sakimi Yokozawa, Rika Umemiya-Shirafuji, and Hiroshi Suzuki. 2020. Cryopreservation of Canine Spermatozoa Using a Skim Milk-Based Extender and a Short Equilibration Time. *Reproduction in Domestic Animals* 55(11):1548–53. doi: 10.1111/rda.13806.
- Ahsan, U., Kamran, Z., Raza., I., Ahmad, S., Babar, W., Riaz, M. H., and Iqbal, Z. 2014. Role of Selenium in Male Reproduction-A review. *Animal Reproduction Science*. 146: 55-62.
- Aldini, Sitiadira Aulia, Nurul Isnaini, Aulia Puspita Anugra Yekti, and Trinil Susilawati. 2022. “Study of the Quality and Integrity of Spermatozoa Acrosome Caps in Frozen Sexing Semen Friesian Holstein Cattle. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 32(2):233–40. doi: 10.21776/ub.jiip.2022.032.02.09.
- Ball, B. A. 2008. Oxidative Stress, Osmotic Stress, and Apoptosis: Impacts on Sperm Function and Preservation in The Horse. *Animal Reproduction Science*. 107: 257-267.
- Calamera, Juan C., Mariano G. Buffone, Gustavo F. Doncel, Santiago Brugo-Olmedo, Sabrina de Vincentiis, Maria M. Calamera, Bayard T. Storey, and Juan G. Alvarez. 2010. Effect of Thawing Temperature on the Motility Recovery of Cryopreserved Human Spermatozoa. *Fertility and Sterility* 93(3):789–94. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.10.021.
- Cenariu, Mihai, Eموke Pall, Mihai Borzan, and Liviu Bogdan. 2018. “Advanced Techniques of Bovine Semen Analysis. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine* 75 1:1. doi: 10.15835/buasvmcn-vm.
- Chauychu-noo, Napapach, Pachara Thananurak, Wuttigrai Boonkum, Thevin Vongpralub, and Vibuntita Chankitisakul. 2021. “Effect of Organic Selenium Dietary

- Supplementation on Quality and Fertility of Cryopreserved Chicken Sperm. *Cryobiology* 98(October 2020):57–62. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.12.008.
- Donoghue, A. M., and G. J. Wishart. 2000. "Storage of Poultry Semen." *Animal Reproduction Science* 62(1–3):213–32. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00160-3.
- Dorostkar, K., Alavi-Shoushtari, S.M. and Mokarizadeh, A., 2012. Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *In Veterinary research forum*. 3(4): 263.
- Gallo, Alessandra, Maria Consiglia Esposito, Elisabetta Tosti, and Raffaele Boni. 2021. "Sperm Motility , Oxidative Status , and Mitochondrial Activity : Exploring Correlation in Different Species." *Antioxidants* 10(1131):1–11.
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: Hafez, E. S. E (Eds), *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins, USA.
- Gazali, M. dan Tambing, S. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati*. 9 (1): 27-32.
- Ismail, Aya A., Abdel Khalek E. Abdel-Khalek, Wael A. Khalil, Ahmed I. Yousif, Islam M. Saadeldin, Mosleh M. Abomughaid, and Mostafa A. El-Hairiry. 2020. "Effects of Mint, Thyme, and Curcumin Extract Nanoformulations on the Sperm Quality, Apoptosis, Chromatin Decondensation, Enzyme Activity, and Oxidative Status of Cryopreserved Goat Semen." *Cryobiology* 97(July):144–52. doi: 10.1016/j.cryobiol.2020.09.002.
- Jamali, N.U., Kaka, A., Khatri, P., Malhi, M., Naeem, M., Memon, A.A., Kaleri, R.R., Janyaro, H. and Kalhor, D.H., 2019. Effect of in vitro Selenium Addition to the Semen Extender on the Spermatozoa Characteristics before and after Freezing in Kundhi Buffalo Bull and in vivo Fertility Rate. *Pak. J. Zool.* 51(1): 317-323.
- Jothipriya, R., Sasikumar, R., Madhankumar, E. K., Pranetha, A., and Kalaiselvi, S. 2016. A Study of Hypo Osmotic Swelling Test in Human Spermatozoa. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 2 (11): 47-68.
- Junaedi, Arifiantini, R. I., Sumantri, C., dan Gunawan, A. 2016. Penggunaan *Dimethyl Sulfoxide* Sebagai Krioprotektan dalam Pembekuan Semen Ayam Kampung. *Jurnal Veteriner*. 17:2.
- Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2841/Kpts/LB.430/8/2012. 2012. Penetapan Rumpun Sapi Peranakan Ongole.
- Karakus, F. N., Kuran, S. B., and Solakoglu, S. 2021. Effect of Curcumin on Sperm Parameters after The Cryopreservation. *European Journal of Obstetrics dan Gynecology and Reproductive Biology*. 267: 161-166.
- Khalil, W.A., El-Hairiry, M.A., Zeidan, A.E. and Hassan, M.A., 2019. Impact of selenium nano-particles in semen extender on bull sperm quality after cryopreservation. *Theriogenology*, 126: 121-127.
- Khan, I. M., Cao, Z., Liu, H., Khan, A., Rahman, S. U., Khan, M. Z., Sathanawongs, A., dan Zhang, Y. 2021. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. *Frontiers in Veterinary Science*. 8 (6): 09-0108.
- Kostaman, T dan Setioko, A. R. 2011. Perkembangan Penelitian Teknik Kriopreservasi untuk Penyimpanan Semen Unggas. *Wartazoa*. 21 (3).
- Len, J. S., Koh, W. S. D., and Tan, S.X. 2019. The Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Cryopreservation. *Bioscience Reports* 39 BSR20191601.
- Martins, A. D., Agarwal, A., and Henkel, R. 2019. *Z.P. Nagy et al. (eds), In Vitro Fertilization*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43011-9_51.

- Masoudi, R., Sharafi, M., Pourazadi, L., Davachi, N. D., Asadzadeh, N., Esmailkhanian, S., and Dirandeh, E. 2020. Supplementation of Chilling Storage Medium with Glutathione Protects Rooster Sperm Quality. *Cryobiology*.
- Mishra, Abhishek Kumar, Akshay Kumar, Dilip Kumar Swain, Sarvajeet Yadav, and Rajesh Nigam. 2018. "Insights into PH Regulatory Mechanisms in Mediating Spermatozoa Functions." *Veterinary World* 11:852–58. doi: 10.14202/vetworld.2018.852-858.
- Naz, Rajesh K. 2014. "The Effect of Curcumin on Intracellular PH (PHi), Membrane Hyperpolarization and Sperm Motility." *Journal of Reproduction and Infertility* 15(2):62–70.
- Nofa, Yulida, Ni Wayan Kurniani Karja, and Raden Iis Arifiantini. 2018. "Status Akrosom Dan Kualitas Post-Thawed Spermatozoa Pada Beberapa Rumpun Sapi Dari Dua Balai Inseminasi Buatan." *Acta VETERINARIA Indonesiana* 5(2):81–88. doi: 10.29244/avi.5.2.81-88.
- Nugraha, C. D., N. Widodo, and S. Suyadi. 2021. "Potential Semen Quality Rate of Ongole Crossbred Bulls at Cattle Breeding Station (UPT PT & HMT) Tuban - Indonesia." *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 788:1–5. doi: 10.1088/1755-1315/788/1/012135.
- Pinto, Francisco M., Ainize Odriozola, Luz Candenias, and Nerea Subir. 2023. "The Role of Sperm Membrane Potential and Ion Channels in Regulating Sperm Function." *International Journal of Molecular Sciences* 24(6995).
- Prihantoko, K.D., Yuliastuti, F., Haniarti, H., Kusumawati, A., Widayati, D.T. dan Budiyanto, A. 2020. The Acrosome Integrity Examination of Post-thawed Spermatozoa of Several Ongole Grade Bull in Indonesia Using Giemsa Staining Method. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 478(1): 1-9.
- Prihantoko, Kurniawan Dwi, Makruf Arif, Asmarani Kusumawati, Diah Tri Widayati, and Agung Budiyanto. 2022. "Evaluation of Sperm DNA Fragmentation Using TUNEL Assay in Different Animal Species." *Advances in Animal and Veterinary Sciences* 10(1):14–19. doi: 10.17582/journal.aavs/2022/10.1.14.19.
- Prihantoko, Kurniawan Dwi, A. Kusumawati, D. T. Widayati, and Mulyoto Pangestu. 2020. "Effects of Storage Duration on Mitochondrial Activity and Dna Fragmentation of Post-Thawed Spermatozoa from Several Ongole Grade Bull in Indonesia." *Veterinary Practitioner* 21(2):264–68.
- Prihantoko, Kurniawan Dwi, Asmarani Kusumawati, Mulyoto Pangestu, Diah Tri Widayati, and Agung Budiyanto. 2022. "Influence of Intracellular Reactive Oxygen Species in Several Spermatozoa Activity in Indonesian Ongole Bull Cryopreserved Sperm." *American Journal of Animal and Veterinary Sciences* 17(1):11–18. doi: 10.3844/ajavsp.2022.11.18.
- Rahimi, Bahareh, Mohammad Panahi, Hajie Lotfi, Mostafa Khalili, Astireh Salehi, Neda Saraygord-Afshari, and Effat Alizadeh. 2023. "Sodium Selenite Preserves RBM-MSCs' Stemness, Differentiation Potential, and Immunophenotype and Protects Them against Oxidative Stress via Activation of the Nrf2 Signaling Pathway." *BMC Complementary Medicine and Therapies* 23(1):131. doi: 10.1186/s12906-023-03952-7.
- Ratnawati, Dian, Nurul Isnaini, and Trinil Susilawati. 2018. "Character Motility of Liquid Semen on Ongole Crossbreed (PO), Bali and Madura Bulls with Diluent CEP-2at Cold Storage." *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* 20(1):21–28.
- Santonastaso, M., Mottola, F., Iovine, C., Colacurci, N., and Rocco, L. 2021. Protective Effects of Curcumin on The Outcome of Cryopreservation in Human Sperm. *Reproductive Science*. 28: 2895-2905.

- Sarastina., Susilawati, T., Ciptadi, G. 2007. Analisa Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa pada Berbagai Bangsa Sapi Menggunakan *Computer Assisted Semen Analysis (CASA)*. *Jurnal Tropika*. 6 (2): 1-12.
- Sariözkan, S., Bucak, M. N., Tuncer, P.B., Tasdemir, U., Kinet., H., Ulutas., P. A. 2010. Effects of Different Extenders and Centrifugation/washing on Postthaw Microscopic-Oxidative Stress Parameters and Fertilizing Ability of Angora Buck Sperm. *Theriogenology*. 73 (2010): 316-323.
- Solihati, Nurcholidah, Siti Darodjah Rasad, Rangga Setiawan, Jl Raya, Bandung Sumedang, and Jatinangor Sumedang. 2020. “Pengaruh Level Glutathione Terhadap Kualitas Post-Thawing Semen Kambing Peranakan Etawah.” *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis* 7(2):138–46.
- Susanti, Y., Priyarsono, D.S. and Mulatsih, S., 2014. Pengembangan peternakan sapi potong untuk peningkatan perekonomian provinsi Jawa Tengah: suatu pendekatan perencanaan wilayah. *Jurnal Agribisnis Indonesia (Journal of Indonesian Agribusiness)*. 2(2): 177-190.
- Susilawati, T., 2011. *Spermatologi*. Malang: UB Press.
- Sutama. I.K., Setiadi., Situmorang,P., Adiati., Budiarsana,I,G,M., Kostaman,T., Maulana, Mulyawan, Sukmana, R. 2000. Uji kualitas semen beku kambing PE dan kambing boer. *Laporan bagian proyek rekayasa teknologi peternakan ARMP- II*. Halaman: 88 – 111.
- Telnoni, S.P., Arifiantini, R.I., Yusuf, T.L., Darwati, S. 2017. SK Kedu semen cryopreservation in Beltsville poultly semen extender and lactated ringer’segg yolk extender usng dimethylsulfoxide. *Asian Journal of Poultry Science*. 11: 14-19.
- Tethool, Angelina Novita, Gatot Ciptadi, Sri Wahjuningsih, and Trinil Susilawati. 2022. “Deterioration of Frozen Semen of Bali Cattle after Cooling at 5°C.” *World’s Veterinary Journal* 12(4):395–404. doi: 10.54203/scil.2022.wvj50.
- Tvrda, Eva, Eva Tušimová, Anton Kováčik, Dušan Paál, Hana Greifová, Abzal Abdramanov, and Norbert Lukáč. 2016. “Curcumin Has Protective and Antioxidant Properties on Bull Spermatozoa Subjected to Induced Oxidative Stress.” *Animal Reproduction Science* 172:10–20. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.06.008.
- Wang, F. N., and B. Y. Suh. 2005. “Revision of Hypo-Osmotic Swelling (HOS) Test with a Proposition of Classified Grading System: Its Comparisons with Four Different Types of Human Sperm Separation Technique.” *Archives of Andrology* 51(4):317–26. doi: 10.1080/014850190922649.
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R.P., Mendoza, A., Alexander, M. and Lakey, J.R., 2021. Cryopreservation: An overview of principles and cell-specific considerations. *Cell Transplantation*. 30: 1-12.