

Efektivitas *Low Density Lipoprotein* (LDL) dari Kuning Telur Ayam terhadap Kualitas Semen Cair Domba

Effectivity of Low Density Lipoprotein (LDL) from Hen Egg yolk in Liquid Preservation of Ram Semen

Dwitya Citraesti¹, Wahono Esthi Prasetyaningtyas^{2*}, Ni Wayan Kurniani Karja³

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor

²Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor

³Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Insitut Pertanian Bogor
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga 16680

*Corresponding author, Email: wahono_esti@apps.ipb.ac.id

Naskah diterima: 29 Januari 2021, direvisi: 9 November 2021, disetujui: 29 November 2021

Abstract

Low-Density Lipoprotein (LDL) extracted from egg yolk has recently known can eliminate the adverse effect associated with the use of fresh egg yolk. The role of LDL in liquid preservation at 4°C of ram sperm has not been explored. The objective of this research was to assess the effects of substituting egg yolk with LDL for use as an extender in ram sperm preservation at 4°C, as well as on spermatozoa motility, viability, morphology, plasma membrane, and acrosome integrity, for 5 days. The semen was divided into five and diluted with Tris–fresh egg yolk (K), Tris–LDL5% (LDL5), Tris–LDL10% (LDL10), Tris–LDL15% (LDL15), and Tris–LDL20% (LDL20). The result showed a significant difference between LDL to fresh egg yolk for ram sperm quality ($P<0.05$). The effectiveness of LDL on sperm quality decreased following the decrease in the concentration of LDL. Even though up to 20% concentration of LDL, it can not preserve the quality of diluted semen for motility, viability, and plasm membrane integrity.

Keywords: egg yolk; liquid preservation; low density lipoprotein; ram semen

Abstrak

Low Density Lipoprotein (LDL) yang diekstraksi dari kuning telur ayam diketahui mampu mengurangi efek negatif dari penggunaan kuning telur utuh. Peran LDL dalam preservasi semen cair domba pada suhu 4°C belum diketahui dengan jelas. Penelitian ini bertujuan mengkaji efektifitas penggantian kuning telur utuh dengan LDL dalam pengencer semen domba yang dipreservasi pada suhu 4°C selama 5 hari penyimpanan. Efektivitas dikaji berdasarkan parameter motilitas, viabilitas, morfologi, keutuhan membran plasma, dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa. Semen dibagi menjadi lima bagian dan diencerkan dengan Tris-kuning telur utuh (K), Tris-LDL5% (LDL5), Tris-LDL10% (LDL10), Tris-LDL15% (LDL15) dan Tris-LDL20% (LDL20). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan signifikan antara penggunaan LDL dibandingkan dengan kuning telur utuh terhadap kualitas spermatozoa domba ($P<0.05$). Efektivitas LDL menurun mengikuti penurunan konsentrasi LDL. Penambahan LDL hingga konsentrasi 20%, tidak mampu mempertahankan kualitas semen cair dalam hal motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma.

Kata kunci: kuning telur; low density lipoprotein; preservasi cair; semen domba

Pendahuluan

Teknologi inseminasi buatan (IB) bertujuan untuk meningkatkan populasi ternak, di Indonesia IB pada domba dapat menggunakan semen beku atau semen cair (Mulyono, 2011). Inseminasi buatan pada domba dengan menggunakan semen segar atau semen cair sudah terbukti keberhasilannya. Efektivitas semen cair lebih baik dibandingkan semen beku sehingga semen cair lebih sering digunakan (Kasimanickam *et al.*, 2011). Semen cair dihasilkan melalui teknik preservasi semen pada suhu 4-5°C (Perumal *et al.*, 2016). Preservasi semen dapat memperpanjang daya hidup dan daya fertilisasi spermatozoa, namun potensinya akan menurun seiring dengan bertambahnya periode penyimpanan. Penurunan potensi terjadi karena spermatozoa mengalami perubahan fisiologis dan struktur (Barbas dan Mascarenhas, 2009). Motilitas spermatozoa serta proses biologis lainnya sangat sensitif terhadap suhu dan akan menurun secara progresif pada saat spermatozoa didinginkan (Chantler *et al.*, 2000) dan efek ini bersifat *irreversible* (Parks, 1997). Efek *irreversible* akibat *cold shock* ini dapat dicegah dengan penambahan agen protektif ke dalam pengencer semen seperti penambahan kuning telur (Parks, 1997). Keberadaan kuning telur dalam pengencer dilaporkan dapat meningkatkan kemampuan fertilisasi spermatozoa (Shannon dan Curson, 1983) dan mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa selama proses pendinginan (De Leeuw *et al.*, 1993).

Kuning telur dilaporkan mengandung banyak komponen seperti 68% *low density lipoprotein* (LDL), 16% *high density lipoprotein* (HDL), 10% globular protein (*livetines*), 4% *phosphoproteins* (*phosvitin*) dan 2% *protein minor* (Li-Chan *et al.*, 1995). Lebih lanjut Ariyani (2006) menyatakan bahwa kuning telur tidak saja merupakan sumber lemak, namun juga sebagai sumber protein yang berkisar antara 15-16% dan vitamin A 40.000 IU per 100 gr. Komponen LDL yang terdapat dalam kuning telur dipercaya merupakan komponen utama yang membantu spermatozoa untuk bertahan selama proses preservasi maupun kriopreservasi (Amirat *et al.*, 2004). Komponen lain seperti granula-granula dalam kuning telur (HDL)

diduga mempunyai pengaruh negatif terhadap viabilitas spermatozoa (Watson, 1976).

Penggantian penggunaan kuning telur dengan LDL telah dilaporkan memiliki daya proteksi terhadap spermatozoa selama proses preservasi dan kriopreservasi (Yamauchi *et al.*, 2009). Lebih lanjut, Dong *et al.*, (2008) melaporkan bahwa kuning telur dan LDL juga termasuk sebagai krioprotektan ekstraseluler. Kuning telur dan LDL tidak mampu melewati membran plasma (Aisen *et al.*, 2002) dan berfungsi melindungi membran plasma sebagai pelapis membran yang mampu menurunkan titik beku medium (Kundu *et al.*, 2002). Efektivitas penambahan *freeze-dried* LDL dalam pengencer spermatozoa menunjukkan hasil yang bervariasi. Penambahan *freeze-dried* LDL pada semen anjing hingga konsentrasi 3% (Neves *et al.*, 2014) dan pada semen beku domba hingga konsentrasi 20% (Moustacas *et al.*, 2011) tidak mampu memberikan daya preservasi yang baik dibandingkan dengan LDL murni ataupun kuning telur utuh. Sementara itu, penambahan *freeze-dried* LDL pada semen beku domba hingga konsentrasi 8% menunjukkan efek perlindungan yang sama dengan penggunaan kuning telur utuh selama proses kriopreservasi (Loaiza-Echeverri *et al.*, 2015). Efektivitas penambahan *freeze-dried* LDL dalam bahan pengencer sangat dipengaruhi oleh suhu penyimpanan dan proses *freeze-dried* (Boyer, 1986) atau bahan pengencer yang digunakan (Neves *et al.*, 2014).

Beberapa penelitian menggunakan LDL sebagai pengganti kuning telur utuh telah dilakukan. Pada pembekuan semen sapi, penambahan LDL mampu mempertahankan kualitas, daya fertilisasi, dan motilitas spermatozoa pasca *thawing* (Amirat *et al.*, 2004). Penambahan LDL pada semen kambing terjadi peningkatan motilitas pasca *thawing* (Al-Ahmad *et al.*, (2008). Pada semen anjing, penambahan LDL konsentrasi 8% dan glutamin 25 mM juga meningkatkan motilitas (Bencharif *et al.*, 2010). Pengencer yang ditambahkan dengan 6% LDL memiliki kualitas krioprotektif yang sama dengan pengencer komersial Equex® STAMP pada kucing (Bencharif *et al.* 2012). Penambahan LDL dari hasil ekstraksi kuning telur pada semen domba cair belum

dilaksanakan, sehingga penelitian ini bertujuan mengkaji efektivitas penambahan LDL hasil ekstraksi dari kuning telur ayam terhadap kualitas spermatozoa domba selama preservasi pada suhu 4° C.

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan 2 ekor domba jantan dewasa umur 5-6 tahun dengan bobot badan berkisar antara 30-40 kg. Semen dikoleksi melalui teknik vagina buatan di Kandang Unit Rehabilitasi Reproduksi FKH IPB. Pengencer yang digunakan adalah kombinasi dari tris (Merck®, Germany), fruktosa (Merck®, Germany), asam sitrat (Merck®, Germany), dan kuning telur. Komposisi pengencer menggunakan hasil modifikasi Schafer-Somi *et al.* (2006), yaitu untuk 10 ml pengencer adalah tris 0,3028 g, asam sitrat 0,17 g, fruktosa 0,125 g, dan air mili-Q 10 ml. Bahan-bahan dihomogenkan menggunakan mesin pengaduk otomatis dengan *magnetic stirer* di dalamnya. Penambahan kuning telur dalam pengencer dijadikan sebagai kontrol (K), sementara LDL ditambahkan ke dalam masing-masing tabung yang tersisa dengan konsentrasi 5% (LDL5), 10% (LDL10), 15% (LDL15), dan 20% (LDL20). Penisilin-streptomisin ditambahkan pada setiap tabung sebanyak 1.000 µg/ml dan streptomisin 1.000 µg/ml.

Low Density Lipoprotein (LDL) diekstraksi melalui metode Moussa *et al.*, (2002) dengan sedikit modifikasi dari Rauch (2013). Sumber LDL berasal dari telur ayam komersial, kemudian kuning telur dipisahkan dari kalaza dan albumin. Kuning telur yang masih memiliki membran vitellin diambil menggunakan spuit, disimpan dalam gelas piala dan direndam dalam air es. Kuning telur ditambah NaCl 0,17 M dengan perbandingan 1:2. Larutan dihomogenisasi dengan *magnetic stirer* selama 1 jam, kemudian larutan disentrifus dengan kecepatan 10.000 G selama 45 menit pada suhu 4°C. Supernatan hasil sentrifus selanjutnya ditambah ammonium sulfat dengan perbandingan 23,3 g per 100 g kuning telur (Rauch, 2013). Campuran *distirer* kembali selama 1 jam. Larutan disentrifus kembali dengan kecepatan 10.000 G selama 45 menit, supernatan dipisahkan dari pellet dan dimasukkan ke dalam membran dialisis

kemudian direndam selama 17 jam dalam aquades untuk menghilangkan ammonium sulfat. Setelah 17 jam, larutan disentrifus kembali dengan kecepatan yang sama seperti sebelumnya selama 45 menit. Supernatan dari hasil tersebut adalah LDL yang digunakan untuk penelitian ini. LDL dikoleksi, kemudian dimasukkan dalam minitube 1,5 ml dan disimpan pada suhu -20°C.

Semen segar dievaluasi sebelum dan setelah pengenceran. Evaluasi sebelum pengenceran meliputi volume, warna, konsistensi, motilitas, dan konsentrasi. Segera setelah pengenceran, sampel dievaluasi nilai motilitas, viabilitas, morfologi normal, keutuhan membran plasma (MPU), dan keutuhan tudung akrosom (TAU). Semen cair siap untuk melalui tahap preservasi suhu 4°C dalam kondisi *water jacket*. Pengamatan H0 dilaksanakan segera setelah pengenceran, kemudian setiap hari selama 5 hari semen dievaluasi kembali seperti setelah pengenceran (H1-H5).

Persentase spermatozoa motil adalah persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan). Nilai motilitas diperoleh dari pergerakan progresif spermatozoa (gerak normal maju) yang disajikan dalam persentase. Motilitas individu spermatozoa dievaluasi secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 200X dan 400X (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% (Toelihere, 1993). Viabilitas spermatozoa adalah persentase spermatozoa yang hidup. Nilai ini dihitung dari perubahan warna kepala spermatozoa dengan sedikitnya 200 spermatozoa yang diamati dengan pewarnaan eosin-nigrosin. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400X (Felipe *et al.*, 2008), yakni spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna bening, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Nilai morfologi normal diperoleh dari pengamatan preparat yang sama dengan pengamatan viabilitas. Nilai morfologi normal diperoleh dari pengamatan morfologi normal dan abnormalitas yang tampak. Kedua parameter tersebut diamati pada 200 spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400x. Evaluasi morfologi normal dipresentasikan dalam bentuk persentase yang

merupakan hasil pembagian jumlah spermatozoa normal dan jumlah sel spermatozoa terhitung.

Persentase MPU merupakan presentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh yang dievaluasi dengan metode *hypoosmotic swelling* (HOS) test (Jeyendran et al., 1984). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 1,35 g fruktosa + 0,73 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 µl larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 20 µl semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek dan dievaluasi dengan bantuan mikroskop cahaya pembesaran 400X terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan membran plasma yang rusak ditandai oleh ekor lurus karena tidak dapat mampu menahan cairan yang masuk ke dalam sel (Ariswan et al., 2014).

Pengamatan TAU menggunakan pewarnaan *coomasie-blue*. Nilai TAU diperoleh dari perubahan warna pada kepala spermatozoa, diamati pada 200 spermatozoa, dengan pembesaran mikroskop 400x. Spermatozoa yang memiliki akrosom utuh terlihat adanya garis pembungkus pada bagian kepala dan garis cincin nukleus berwarna lebih biru (gelap). Sebaliknya, pada akrosom rusak garis-garis tersebut tidak tampak dan memiliki warna terang pada anterior atau terang pada keseluruhan kepala. Hasil evaluasi disajikan bentuk persentase dari hasil pembagian jumlah spermatozoa dengan tudung akrosom utuh dan total spermatozoa terhitung.

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pengamatan

berulang sebanyak 5 kali. Data penelitian yang berupa persentase dianalisis menggunakan ANOVA dan jika ditemukan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Duncan. Data diolah menggunakan program SPSS versi 15 pada taraf kepercayaan 95% ($P < 0.05$).

Hasil dan Pembahasan

Kualitas semen cair domba dalam pengencer yang ditambahkan dengan LDL pada periode penyimpanan lima hari ditampilkan pada Tabel 1. Motilitas spermatozoa setelah diencerkan dengan LDL 5%, 10%, dan 15% nilainya lebih rendah daripada spermatozoa dalam pengencer kuning telur (K) atau LDL 20% ($P < 0.05$). Pola yang sama teramati sampai hari ke-5 penyimpanan. Penurunan motilitas spermatozoa pada semua kelompok perlakuan seiring dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan semen ($P < 0.05$). Setelah hari ke-5 penyimpanan, motilitas spermatozoa sudah di bawah 40% pada semua kelompok perlakuan. Rizal (2006) menyatakan sebab dari penurunan persentase motilitas, yaitu penurunan pH dalam semen yang berkaitan dengan peningkatan kebutuhan energi dalam bentuk Adenosin Trifosfat (ATP). Seiring lama penyimpanan, ketersediaan suplai energi semakin berkurang, sehingga terjadi proses respirasi anaerob yang menghasilkan ATP dan asam laktat. Asam laktat tersebut merubah pH medium pengencer menjadi lebih asam dan meningkatkan osmolaritas sehingga menurunkan daya motilitas spermatozoa.

Viabilitas semen cair domba dalam pengencer dengan LDL periode penyimpanan lima hari ditampilkan pada Tabel 2. Nilai viabilitas spermatozoa setelah proses pengenceran

Tabel 1. Motilitas spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	H0 (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	80.0±0.0aA	74.0±2.2aB	69.0±2.2aC	58.0±2.7aD	48.0±2.7aE	34.0±2.2aF
LDL5	52.0±2.7bA	42.0±2.7bB	32.0±2.7bC	27.0±2.7bD	17.0±2.7bE	11.0±2.2bF
LDL10	61.0±2.2cA	53.0±2.7cB	47.0±2.7cC	39.0±2.2cD	31.0±2.2cE	17.0±2.7cF
LDL15	69.0±2.2dA	59.0±2.2dB	53.0±2.7dC	48.0±2.7dD	42.0±2.7dE	23.0±2.7dF
LDL20	78.0±2.7aA	66.0±2.2eB	61.0±2.2eC	52.0±2.7eD	46.0±4.2aE	29.0±2.2eF

Huruf a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) pada kolom yang sama. Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$) pada baris yang sama. Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

Tabel 2. Viabilitas spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	83.6±2.2aA	80.0±1.3aB	73.8±2.3aC	69.8±2.6aD	64.7±1.6aE	59.7±1.1aF
LDL5	56.6±3.7bA	53.6±2.0bA	43.0±2.6bB	40.5±0.9bC	37.5±1.5bC	34.1±2.4bD
LDL10	66.8±1.6cA	62.5±1.8cB	58.4±1.7cC	54.9±2.0cD	50.2±1.5cE	46.7±2.9cF
LDL15	75.0±2.7dA	70.9±1.9dAB	67.8±2.5dB	63.1±3.5dC	57.5±4.2dD	53.4±4.4dD
LDL20	75.5±1.5dA	73.2±1.2eA	71.5±2.0aAB	68.3±2.4aB	61.3±5.1aDC	57.1±4.8aDC

Huruf a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$). Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ($P<0,05$). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density

menunjukkan pengencer yang ditambah kuning telur lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer dengan LDL 5%, 10%, 15%, dan 20% ($P<0.05$). Namun, sejak hari ke-2 hingga hari ke-5 penyimpanan, nilai viabilitas kontrol dan pengencer LDL 20% tidak menunjukkan perbedaan nilai ($P>0.05$). Sementara itu, viabilitas terendah terdapat pada pengencer dengan penambahan LDL 5% ($P<0.05$). Rendahnya daya tahan hidup disebabkan aktivitas metabolisme anaerob spermatozoa yang membentuk asam laktat dalam media pengencer yang minim substrat sumber energi. Asam laktat yang berlebih dalam pengencer merubah pH yang dapat menimbulkan efek racun dan kematian yang tinggi bagi spermatozoa (Widjaya, 2011).

Nilai viabilitas baik kontrol maupun perlakuan tampak menurun sampai hari ke-5 ($P<0.05$). Menurut Juniandri *et al.*, (2014), senyawa yang berperan menjaga fungsi kehidupan spermatozoa adalah lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur. Komponen ini memiliki molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa namun berfungsi melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa. Kerusakan membran sel sperma-

tozoa dapat menyebabkan permeabilitas membran meningkat sehingga memungkinkan partikel-partikel kontaminan masuk ke dalam sel dan menyebabkan sel mati (Juniandri *et al.*, 2014).

Morfologi normal spermatozoa yang diamati setiap hari selama periode penyimpanan 5 hari (Tabel 3), baik penambahan kuning telur (K) ataupun LDL tidak menimbulkan pengaruh yang signifikan terhadap morfologi normal ($P>0.05$). Tidak adanya pengaruh perlakuan tersebut diduga karena pada perlakuan kuning telur utuh ataupun LDL, keduanya menyuplai senyawa lesitin. Lesitin mampu mempertahankan kualitas spermatozoa dengan mekanisme berikatan dengan membran plasma (White, 1993). Jenis abnormalitas yang diamati pada penelitian ini adalah abnormalitas sekunder yang terdiri dari ekor yang melingkar, kepala tanpa ekor, dan kepala pecah. Abnormalitas sekunder terjadi diluar proses spermatogenesis.

Keutuhan membran plasma spermatozoa pada pengencer dengan penambahan LDL selama lima hari penyimpanan ditunjukkan Tabel 4. Semua kelompok perlakuan secara umum menunjukkan penurunan nilai MPU seiring lama hari penyimpanan ($P<0.05$).

Tabel 3. Morfologi normal spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	98.7±1.3A	98.0±1.0AB	97.6±1.1AB	97.0±0.8BC	96.8±0.8BC	95.9±1.0C
LDL5	97.7±0.7A	96.9±1.3A	96.2±1.5AB	96.0±1.4AB	95.0±2.3AB	94.0±3.1BC
LDL10	97.7±0.7A	97.2±0.9AB	96.3±1.3ABC	96.3±1.0ABC	95.5±1.9BC	94.6±2.4C
LDL15	97.7±0.7A	96.9±0.8AB	96.5±0.9BC	96.2±0.4BC	95.9±0.6BC	95.6±0.8C
LDL20	97.5±0.6A	97.1±0.6AB	96.5±0.8BC	96.4±0.6BC	96.0±0.6C	95.6±0.8C

Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ($P<0,05$). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

Tabel 4. Membran Plasma Utuh (MPU) spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	91.0±3.1aA	88.9±1.4aAB	86.1±0.7aB	82.6±2.0aC	78.6±1.8aD	75.9±2.9aD
LDL5	72.1±2.2bA	67.7±2.5bB	64.9±2.6bBC	62.3±3.5bCD	58.8±3.8bDE	56.6±4.0bE
LDL10	77.5±1.7cA	73.4±1.1cB	69.8±2.9cC	66.8±2.4cD	65.7±1.6cDE	63.9±2.0cE
LDL15	81.7±1.9dA	75.8±2.5dB	72.5±2.4cC	69.8±2.8cCD	67.3±1.9cDE	65.5±2.2cdF
LDL20	82.4±1.2eA	80.3±0.8eAB	77.1±3.1dBC	75.0±3.4dCD	72.4±3.9dD	68.2±2.8dE

Superscript a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$). *Superscript* A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ($P<0.05$). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

Setelah pengenceran nilai MPU kontrol lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer yang ditambahkan LDL 5%, 10%, 15%, dan 20% ($P<0.05$). Kondisi tersebut bertahan hingga hari ke-5 penyimpanan. Hal tersebut dijelaskan oleh Ducha *et al.*, (2012) bahwa penambahan kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) sehingga keutuhan ultrastruktur dan membran spermatozoa dapat dijaga dengan baik. Makromolekul dalam kuning telur berupa lipid dan protein akan menjadi target oksidasi oleh ROS, sehingga ROS tidak akan mengoksidasi membran spermatozoa. Sehingga keutuhan membran plasma spermatozoa dapat terjaga akibat penambahan kuning telur dalam pengencer.

Kualitas tudung akrosom spermatozoa dalam pengencer dengan LDL pada periode penyimpanan 5 hari ditampilkan Tabel 5. Persentase tudung akrosom utuh (TAU) berkurang mengikuti lama hari penyimpanan. Kelompok perlakuan kontrol, LDL 15% dan 20% menunjukkan nilai tudung akrosom utuh (TAU) lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer dengan LDL 5% dan 10% ($P<0.05$) setelah pengenceran. Ketiganya

tidak menunjukkan perbedaan hingga hari ke-5 penyimpanan ($P>0.05$). Hal yang sama juga terjadi pada LDL 5% dan 10% yang tidak berbeda nilainya hingga akhir penyimpanan ($P>0.05$). Namun, ditinjau dari persentase rata-rata TAU, kelompok kontrol memiliki nilai TAU lebih tinggi dibanding LDL 15% dan 20%. Menurut Hammadeh *et al.*, (2001), kuning telur dapat berperan sebagai krioprotektan dan melindungi akrosom spermatozoa dari kerusakan. Keberadaan kuning telur di dalam pengencer, menyebabkan spermatozoa memiliki krioprotektan ekstrasel sehingga lebih dapat melindungi integritas membran spermatozoa. Nilai TAU menunjukkan kelompok kontrol lebih mampu mempertahankan keutuhan tudung akrosom spermatozoa.

Kesimpulan

Penambahan LDL hingga konsentrasi 20%, tidak mampu mempertahankan kualitas semen cair dalam hal motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma. Penambahan LDL dengan konsentrasi 20% pada pengencer semen cair domba memiliki daya preservasi yang mendekati daya preservasi pengencer kuning telur. Meskipun, kemampuan preservasi

Tabel 5. Tudung Akrosom Utuh (TAU) spermatozoa domba dalam pengencer dengan penambahan LDL

Perlakuan	Lama Penyimpanan					
	HO (%)	H1 (%)	H2 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H5 (%)
K	99.1±0.7aA	97.9±2.0aAB	97.2±1.6aABC	96.2±1.4aBCD	95.6±1.4aCD	95.0±1.5aD
LDL5	96.3±1.7bA	94.4±2.1bAB	93.2±2.5bBC	91.7±2.2bBCD	90.3±2.3bCD	88.8±2.5bD
LDL10	97.0±2.0bcA	95.9±1.8abAB	94.2±2.0bABC	93.0±2.4bcBCD	92.0±2.6bcCD	90.8±3.0bcD
LDL15	98.0±1.2abcA	96.8±1.4abAB	95.8±1.8abABC	94.4±2.4abcBCD	92.9±3.4abcCD	91.8±3.1abcD
LDL20	98.3±0.8acA	97.0±1.5aAB	96.0±1.8abABC	95.3±1.6acBC	94.4±2.4acBC	93.6±2.6acC

Huruf a,b,c,d,e yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0.05$). Huruf A,B,C,D,E,F yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar baris ($P<0.05$). Kuning telur utuh 20% (K); Ekstrak Low Density Lipoprotein 5% (LDL5); Ekstrak Low Density Lipoprotein 10% (LDL10); Ekstrak Low Density Lipoprotein 15% (LDL15); Ekstrak Low Density Lipoprotein 20% (LDL20). Penyimpanan semen cair pada hari ke-0 (H0), hari ke-1 (H1), hari ke-2 (H2), hari ke-3 (H3), hari ke-4 (H4), hari ke-5 (H5).

pengencer yang ditambahkan LDL 20% belum menyamai pengencer kuning telur.

Daftar Pustaka

- Aisen, E., Medina, V., and Venturino, A. 2002. Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57: 1801–8.
- Al-Ahmad, M.Z.A., Chatagnon, G., Amirat Briand, L., Moussa, M., Tainturier, D., Anton, M., and Fieni., F. 2008. Use of Glutamine and Low-Density Lipoproteins Isolated from Egg Yolk to Improve Buck Semen Freezing. *Reprod Domest Anim*. 43: 429–436.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., and Gerard, O. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*. 61: 895–907.
- Ariswan, Saili, T., Baa, L.O., and Rahadi, S. 2014. Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing perranakan ettawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *JITRO*. (1)1: 79-87.
- Ariyani, E. 2006. Penetapan kandungan kolesterol dalam kuning telur pada ayam petelur. Dalam Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian 2006. Balai Penelitian Ternak.
- Barbas, J.P., and Mascarenhas, R.D. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*. 10: 49–62.
- Bencharif, D., Amirat, L., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S. 2010. The advantages of LDL (low density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*. 70: 1478–88.
- Bencharif, D., Amirat-Briand, L., Garand, A., Anton, M., Schmitt, E., Desherces, S., Delhomme, G., Langlois, ML., Barrière, P., Destrumelle, S., Vera-Munoz, O., Tainturier, D. 2012. The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Res Vet Sci*. 93:440-447.
- Boyer RF. 1986. *Modern Experimental Biochemistry*. California (US): Addison-Wesley. Hal 52-53
- Chantler, E., Abraham-Peskir, J.V., Little, S., McCann, C., and Medenwaldt, R. 2000. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology*. 41:125–34.
- De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H., Colenbrander, B., and Verkleij, A.J. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 30:32–44.
- Dong, Q., Rodenburg, S.E., Huang, C., and VandeVoort, C.A. 2008. Effect of pre-freezing conditions on semen cryopreservation of rhesus monkey. *Theriogenology*. 70: 61–9.
- Ducha, N., Susilawati, T., Aulanni'am, Sri, W., and Pangestu, M. 2012. Ultrastructure and fertilizing ability of limousin bull sperm after storage in cep-2 extender with and without egg yolk. *PJBS*. 15(20): 979-985.
- Felipe, Y.E., Juarez-Mosqueda M.L., Hernandez-Gonzales, E.O., and Velancia, J.J. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compred by staining techniques. *Acta Vet Bras*. 2:123-130.
- Hammadeh, M.E., George, T., Rosenbaum, P., and Schmidt, W. 2001. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal sperm. *J Androl*. 32: 331-336.
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez, P.M., Crabo, B.G., and Zenevald, L.J. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *JRI*. 70: 219-228.
- Juniandri, Susilawati, T., and Isnaini, N. 2014. Perbandingan Pengencer Andromed dan CEP-2 terhadap Kualitas Spermatozoa

- Sapi Hasil Seksing dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *J Vet.* 15(2): 252-262.
- Kasimanickam, R., Vanmathy, K., Ahmed, T., and Kevin, P. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Rumin Res.* 99: 208-213.
- Kundu, C.N., Chakraborty, J., Dutta, P., Bhattacharyya, D., and Ghosh, A. 2002 Effects of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reprod.* 123: 907-13.
- Li-Chan, E.C.Y., William, D.P., and Shuryo, N. 1995. The chemistry of egg and egg products. In *Egg Science and Technology Fourth Edition*. Stadelman, W.J., Newkirk, D., and Newby, L. (Ed). The Haworth Press Inc, New York (US). pp 105-151.
- Loaiza-Echeverri, A.M., Cruz, B.C., Snoeck, P.P.N., Mora, L.C.O., Parzewski, B., Neves, M.M., Heneine, L.G.D., and Henry, M. 2015. Low density lipoproteins added to an extender frozen or lyophilized are evenly efficient in cryoprotecting bovine sperm cells than when 16% whole egg yolk was added. *Semin Cienc Agrar.* 36: 1335-1346.
- Mulyono, S. 2011. *Teknik Pembibitan Kambing dan Domba*. Jakarta (ID): Penebar Swadaya. Hal 21.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., and Anton, M. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 57: 1695-706.
- Moustacas, V.S., Zaffalon, F.G., Lagares, M.A., Loaiza-Eccheverri, A.M., Varago, F.C., Neves, M.M., Heneine, L.G., Arruda, R.P., and Henry, M. 2011. Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 75: 300-307.
- Neves, M.M., Heneine, L.G.D., and Henry, M. 2014. Cryoprotection effectiveness of low concentrations of natural and lyophilized LDL (low density lipoproteins) on canine spermatozoa. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 66: 769-777.
- Parks, J.E. 1997. *Hypothermia and mammalian gametes in Reproductive Tissue Banking*. San Diego: Academic Press. pp 229-261.
- Perumal, P., Srivastava, S.K., Ghosh, S.K., Baruah, K.K., Khan, M.H., Rajoriya, J.S., and Srivastava, N. 2016. Effect of low density lipoprotein on replacement of egg yolk in liquid preservation of mithun semen. *Indian J Anim Sci.* 86 (4): 55.
- Rasul, A., Ahmad, N., and Anzar, M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl.* 22: 278-283.
- Rauch, A. 2013. Cryopreservation of bovine semen in egg yolk based extenders. *Thesis*. Department of Large Animal Clinical Sciences, University of Saskatchewan. Saskatoon (CA).
- Rizal, M. 2006. Pengaruh penambahan laktosa di dalam pengencer tris terhadap kualitas semen cair domba garut. *J Indon Trop Anim Agric.* 31(4): 224-231.
- Schafer-Somi, S., Kluger, S., Knapp, E., Klein, D., and Aurich, C. 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology.* 66: 173-182.
- Shannon, P., and Curson, B. 1983. Effect of egg yolk levels on the fertility of diluted bovine sperm stored at ambient temperatures. *N Z J Agric Res.* 26(2): 187-189.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung (ID): Angkasa.
- Watson, P.F. 1976. Electroejaculation, semen characteristics, and semen preservation of the brindled gnu. *J Reprod Fert.* 47: 123-6.

- Widjaya, N. 2011. Efek penambahan vitamin e dalam pengencer glukosa terhadap daya tahap hidup spermatozoa domba pada suhu 5°C. *JSPI*. 9 (1): 25-31.
- White, I.G. 1993. Lipid and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev*.5: 639-658.
- Yamauchi, S., Nakamura, S., Lay, K.M., Azuma, T., Yakabi, T., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K., and Tatemoto, H. 2009. Characteristics of Okinawan active Agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender. *J Reprod Dev*. 55: 558–565.