*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

# Kualitas Spermatozoa Epididimis Sapi Bali Dengan Pengencer Air Kelapa Tua Yang Disimpan Pada Suhu 5°C

## *Quality of Epididymal Spermatozoa from Bali Cattle Using Mature Coconut Water as an Extender, Stored at 5°C*

**Veronica Francisca Mado[1)], Jeffrie Wattimena[2*)], Isak P Siwa[3)]**

[1, 2, 3] *Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Ambon. Jl. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka-Ambon 97234, Indonesia*

[*] *Corresponding Author e-mail: jeffriewm62@gmail.com*

**Abstrak**

Penelitian ini bertujuan mengetahui kualitas spermatozoa epididimis sapi Bali dalam pengencer air kelapa tua (AKT) dan kuning telur (KT) selama penyimpanan pada suhu 5°C. Sebanyak enam testis sapi Bali umur 3–4 tahun dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH). Spermatozoa dikoleksi dari cauda epididimis menggunakan kombinasi teknik slicing, pembilasan, dan penekanan (bilas-tekan). Pengencer terdiri atas lima perlakuan, yaitu P1 (AKT 90% + KT 10%), P2 (85% + 15%), P3 (80% + 20%), P4 (75% + 25%), dan P5 (70% + 30%). Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan enam ulangan. Data dianalisis menggunakan analisis ragam dan uji Beda Nyata Terkecil. Karakteristik spermatozoa segar meliputi konsentrasi 2.150 × $10^6$ spermatozoa/mL, motilitas 76,83%, viabilitas 80,17%, abnormalitas 10%, butiran sitoplasma 24%, dan membran plasma utuh (MPU) 81%. Selama penyimpanan, motilitas, viabilitas, dan MPU menurun. Perlakuan P4 paling baik mempertahankan kualitas spermatozoa hingga lima hari dan layak digunakan untuk inseminasi buatan (IB). Namun, penyimpanan empat hari direkomendasikan untuk memperoleh hasil IB maksimal.

Kata Kunci: spermatozoa, epididimis, sapi Bali, air kelapa tua, kuning telur

**Abstract**

*This study aimed to evaluate the quality of Bali cattle epididymal spermatozoa stored at 5°C in an extender composed of mature coconut water (MCW) and egg yolk (EY). Six testes from 3–4-year-old Bali bulls were collected from a slaughterhouse. Spermatozoa were harvested from the cauda epididymis using a combination of slicing, rinsing, and squeezing techniques. Five extender treatments were tested: P1 (90% MCW + 10% EY), P2 (85% MCW + 15% EY), P3 (80% MCW + 20% EY), P4 (75% MCW + 25% EY), and P5 (70% MCW + 30% EY). The study employed a completely randomized design with five treatments and six replicates. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) followed by the Least Significant Difference (LSD) test. Fresh spermatozoa characteristics included a concentration of 2,150 × $10^6$ spermatozoa/mL, 76.83% motility, 80.17% viability, 10% abnormality, 24% cytoplasmic droplets, and 81% intact plasma membranes (IPM). During storage, motility, viability, and the proportion of spermatozoa with intact plasma membranes declined. Treatment P4 was the most effective in maintaining sperm quality for up to five days, rendering it suitable for artificial insemination (AI). However, a storage duration of four days is recommended to achieve optimal AI results.*

*Keywords: spermatozoa, epididymis, bali cattle, mature coconut water, egg yolk*

Received: 30 Agustus 2026
Accepted: 12 November 2026
© 2026 Veronica Francisca Mado, Jeffrie Wattimena, Isak P Siwa

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License

## A. PENDAHULUAN

Upaya peningkatan populasi dan mutu genetik Sapi Bali sebagai salah satu sumber daya ternak asli Indonesia yang potensial sangat penting untuk mendukung ketahanan pangan nasional dan fokus riset yang sejalan dengan tujuan SDGs yang ke-2 yaitu mengakhiri kelaparan. Inseminasi Buatan (IB) merupakan teknologi reproduksi yang efektif dan efisien untuk mencapai

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

tujuan ini. Keberhasilan program IB sangat bergantung pada kualitas semen, baik semen segar maupun semen yang telah diawetkan melalui proses pengenceran dan penyimpanan (Ditjen PKH, 2020).

Penggunaan pengencer semen sintetis dalam teknologi reproduksi, khususnya untuk penyimpanan semen sapi Bali, umumnya memerlukan biaya relatif tinggi dan bergantung pada bahan kimia komersial, sehingga menjadi keterbatasan dalam penerapan teknologi reproduksi di tingkat peternakan rakyat. Kondisi ini mendorong upaya pencarian bahan pengencer alternatif yang lebih ekonomis, mudah diperoleh, dan berbasis sumber daya lokal, salah satunya adalah air kelapa. Pada sapi Bali, pemanfaatan semen epididimis memiliki nilai strategis karena memungkinkan penyelamatan materi genetik dari pejantan unggul yang mati mendadak atau tidak dapat ditampung semennya secara konvensional, sehingga mendukung pelestarian dan pengembangan plasma nutfah sapi lokal Indonesia (Susilawati, 2019; Das & Singh, 2022).

Sebagian besar penelitian sebelumnya melaporkan penggunaan air kelapa muda sebagai pengencer alami karena kandungan karbohidrat, elektrolit, dan mineralnya yang mampu mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan dingin (Khairani et al., 2023). Namun demikian, air kelapa tua hingga saat ini masih jarang dimanfaatkan dan sering menjadi limbah agroindustri yang terbuang, dan berpotensi menimbulkan pencemaran lingkungan apabila tidak dikelola dengan baik (Rindengan & Novarianto, 2015).

Penelitian tentang penggunaan air kelapa tua (AKT) sebagai pengencer semen masih terbatas, seperti pada semen Kambing Boer (Sudarman, et al., 2021). Perbedaan komposisi air kelapa tua dan muda seperti pH air kelapa muda 4.7±0.1 dan pH air kelapa tua 5.2±0.1 (Santosa, *et al*., 1995 sitasi Jean *et al*., 2009), yang secara kimiawi terjadi penurunan tingkat keasaman yang bergerak mendekati netral. Perubahan nilai pH ini terjadi karena berkurangnya konsentrasi asam-asam organik bebas di dalam air kelapa. Air kelapa muda kaya akan asam organik seperti asam malat, asam sitrat, asam asetat, dan asam askorbat (Vitamin C). Seiring bertambahnya umur kelapa, asam-asam organik ini dirombak dan digunakan dalam proses metabolisme buah, sehingga keasamannya menurun dan pH-nya naik. Selain itu terjadi penurunan kandungan gula seiring dengan meningkatnya umur kelapa. Air kelapa tua memiliki komposisi nutrisi yang berbeda dari air kelapa muda, terutama pada kandungan gula dan mineral, yang berpotensi dimanfaatkan sebagai media pendukung kehidupan spermatozoa. Penelitian mengenai pemanfaatan air kelapa tua sebagai pengencer semen epididimis sapi Bali pada suhu penyimpanan 5°C masih sangat terbatas, sehingga penelitian ini penting dilakukan untuk menghasilkan teknologi pengencer semen yang lebih murah, aplikatif, dan sesuai dengan kondisi peternakan rakyat di Indonesia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengencer air kelapa tua (AKT) dan kuning telur (KT) terhadap kualitas spermatozoa epididimis sapi Bali yang disimpan pada suhu 5°C dan mengetahui profil penurunan kualitas spermatoza epididimis sapi Bali dalam pengencer air kelapa tua, kuning telur selama penyimpanan pada suhu 5°C.

## B. METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan selama 1 bulan yaitu dari bulan Mei sampai dengan Juni 2026 di Laboratorium Bioteknologi Reproduksi dan Fisiologi Ternak, Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura, Ambon. Sampel berupa testis dan epididimis sapi Bali umur 3-4 tahun sebanyak enam buah dikoleksi dari Rumah Potong Hewan (RPH) Kota Ambon untuk selanjutnya diproses dan dievaluasi di laboratorium.

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

**Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan meliputi alat bedah (gunting dan pisau bedah), tabung reaksi, gelas piala, mikroskop, lemari es (refrigerator), serta peralatan laboratorium pendukung lainnya. Bahan yang digunakan meliputi testis dan epididimis sapi Bali, air kelapa tua (AKT), kuning telur (KT), larutan NaCl fisiologis 0,9%, penisilin, streptomisin, dan bahan pendukung untuk evaluasi kualitas spermatozoa.

**Prosedur atau Pelaksanaan Penelitian**

Testis dan epididimis sapi Bali dikoleksi dari RPH Kota Ambon, kemudian dibawa ke laboratorium. Epididimis dipisahkan dari testis dan dibilas menggunakan larutan NaCl fisiologis 0,9% hingga bersih. Spermatozoa dikoleksi dari cauda epididimis menggunakan kombinasi teknik *slicing*, pembilasan, dan penekanan (bilas-tekan) sesuai Rizal (2005) dalam Wattimena *et al.,* (2009). Cauda epididimis disayat beberapa kali, kemudian dibilas dan ditekan dalam larutan NaCl fisiologis. Spermatozoa diencerkan menggunakan lima kombinasi pengencer AKT dan KT, masing-masing sebanyak 100 mL, yaitu:

P1: AKT 90% + KT 10%
P2: AKT 85% + KT 15%
P3: AKT 80% + KT 20%
P4: AKT 75% + KT 25%.
P5: AKT 70% + KT 30%.

Setiap pengencer ditambahkan penisilin dan streptomisin masing-masing dengan konsentrasi 1.000 IU/mL. Spermatozoa diencerkan hingga mencapai konsentrasi 100 juta spermatozoa motil/mL. Selanjutnya, tabung reaksi ditutup rapat, dimasukkan ke dalam gelas piala berisi air, kemudian disimpan dalam refrigerator pada suhu 5°C selama lima hari. Evaluasi kualitas spermatozoa dilakukan setiap hari. Variabel pengamatan sebelum perlakuan meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas, butiran sitoplasma, dan membran plasma utuh (MPU). Setelah perlakuan, variabel yang diamati meliputi motilitas, viabilitas, dan MPU.

**Analisis Data**

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan analisis ragam (*Analysis of Variance/ANOVA*) berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL), yang terdiri atas lima perlakuan dan enam ulangan. Apabila terdapat perbedaan yang nyata antarperlakuan, analisis dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) sesuai Yuli dan Peni (2020).

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Karakteristik Spermatozoa Epididimis

Hasil evaluasi (Tabel 1), karakteristik spermatozoa segar epididimis sapi Bali sebelum diberikan perlakuan menunjukkan bahwa rataan konsentrasi spermatozoa mencapai 2.150 $x$ $10^6$ spermatozoa/ml, motilitas 76,83%, viabilitas 80,17%, abnormalitas 10,00%, butiran sitoplasma 24,00%, dan membran plasma utuh (MPU) 81,00%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa spermatozoa epididimis sapi Bali memiliki kualitas yang baik dan dapat diproses lebih lanjut sebagai sampel penelitian. Cauda epididimis merupakan tempat penyimpanan spermatozoa yang telah mengalami proses pematangan sehingga memiliki kemampuan fertilisasi yang relatif tinggi dan dapat dimanfaatkan untuk inseminasi buatan maupun fertilisasi *in vitro* (Cunha *et al.,* 2019;

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

Tethool *et al.,* 2023).

Motilitas spermatozoa 76,83%, yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa sebagian besar spermatozoa masih mampu bergerak secara progresif. Nilai tersebut lebih tinggi dibandingkan batas minimal motilitas yang umumnya dipersyaratkan untuk pemanfaatan spermatozoa dalam program reproduksi berbantuan, sehingga mengindikasikan bahwa spermatozoa masih memiliki potensi fertilitas yang baik. Standar kelayakan semen segar untuk diproses lebih lanjut menjadi semen beku adalah dengan motilitas spermatozoa minimal 70%, namun demikian terdapat beberapa referensi yang memberikan toleransi hingga 60%. Semen dengan tingkat motilitas di bawah kriteria tersebut rentan mengalami kerusakan fatal pada saat proses ekuilibrasi dan pembekuan berlangsung (Aisah *et al.,* 2017; Fafandri *et al.,* 2023). Tingginya motilitas berkaitan erat dengan ketersediaan energi mitokondria, integritas membran plasma, serta proses pematangan spermatozoa selama berada di epididimis (Hezavehei *et al.,* 2018; Prastowo *et al.,* 2018). Penelitian spermatozoa epididimis sapi Bali juga menunjukkan bahwa motilitas merupakan salah satu parameter utama dalam menentukan kualitas sperma-tozoa sebelum dilakukan preservasi (Tethool *et al.,* 2023).

Viabilitas spermatozoa 80,17% dan MPU 81,00%, menunjukkan bahwa sebagian besar spermatozoa masih memiliki integritas membran plasma yang baik. Membran plasma yang utuh berperan penting dalam mempertahankan keseimbangan osmotik, metabolisme sel, kapasitasi, reaksi akrosom, serta proses fertilisasi. Hubungan yang erat antara viabilitas dan keutuhan membran plasma menunjukkan bahwa spermatozoa masih mampu mempertahankan fungsi fisiologisnya selama proses penanganan sebelum dilakukan kriopreservasi ataupun perlakuan lainnya (Hezavehei *et al.,* 2018). Hasil ini juga sejalan dengan penelitian Indriastuti *et al.,* (2020) yang menyatakan bahwa viabilitas dan integritas membran plasma merupakan indikator penting dalam menentukan kelayakan semen sapi Bali untuk dipreservasi.

Abnormalitas spermatozoa 10,00%, menunjukkan bahwa sekitar 90% spermatozoa memiliki morfologi normal, sehingga masih berada pada kisaran yang dapat diterima untuk menunjang fertilitas. Rendahnya tingkat abnormalitas mencerminkan bahwa proses spermatogenesis berlangsung dengan baik dan spermatozoa yang tersimpan di cauda epididimis telah mengalami pematangan secara optimal. Meskipun demikian, persentase butiran sitoplasma sebesar 24,00% menunjukkan masih terdapat spermatozoa yang membawa sisa sitoplasma (*cytoplasmic droplet*). Keberadaan butiran sitoplasma dalam jumlah tinggi diketahui dapat meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) sehingga berpotensi menurunkan motilitas, viabilitas, dan stabilitas membran spermatozoa selama penyimpanan (Hezavehei *et al.,* 2018). Namun demikian, spermatozoa epididimis kondisi tersebut masih sering dijumpai karena proses pelepasan sitoplasma belum sepenuhnya sempurna ketika spermatozoa berada di saluran epididimis (Tethool et al., 2023).

Tabel 1. Karakteristik Spermatozoa Segar Epididimis Sapi Bali

| Kualitas Spermatozoa | Ulangan | | | | | | Rataan |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| Konsentrasi (jt/ml) | 1390 | 1450 | 3580 | 3400 | 1340 | 1740 | 2150 |
| Motilitas (%) | 73,00 | 72,00 | 84,00 | 84,00 | 78,00 | 70,00 | 76,83 |
| Viabilitas (%) | 78,00 | 80,00 | 81,00 | 84,00 | 77,00 | 81,00 | 80,17 |
| Abnormalitas (%) | 14,00 | 14,00 | 9,00 | 7,00 | 9,00 | 7,00 | 10,00 |
| Butiran Sitoplasma (%) | 18,00 | 13,00 | 29,00 | 33,00 | 23,00 | 28,00 | 24,00 |
| MPU(%) | 84,00 | 76,00 | 81,00 | 83,00 | 81,00 | 81,00 | 81,00 |

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

## 2. Kualitas Spermatozoa Epididimis Sapi Bali Yang Disimpan Pada Suhu 5$^{o}$C

### 2.1. Motilitas Spermatoza Epididimis Sapi Bali

Motilitas spermatozoa epididimis sapi Bali yang disimpan pada suhu 5°C menunjukkan penurunan secara bertahap pada seluruh perlakuan selama lima hari penyimpanan (Tabel 2). Pada hari pertama, motilitas spermatozoa masih relatif tinggi, yaitu berkisar antara 68,48% hingga 73,85%, dan tidak menunjukkan perbedaan nyata antarperlakuan (P>0,05). Penurunan motilitas mulai terlihat pada hari kedua hingga hari kelima, yang ditandai dengan menurunnya kemampuan gerak progresif spermatozoa akibat proses metabolisme yang terus berlangsung selama penyimpanan dingin. Kondisi tersebut menyebabkan cadangan energi (ATP) semakin berkurang, disertai meningkatnya kerusakan membran plasma akibat cold shock dan stres oksidatif sehingga kemampuan spermatozoa untuk bergerak progresif semakin menurun (Sawitri *et al.,* 2021).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan P3 mampu mempertahankan motilitas spermatozoa lebih baik dibandingkan perlakuan lainnya selama penyimpanan. Motilitas pada perlakuan ini menurun secara bertahap dari 73,85% pada hari pertama menjadi 65,95%, 57,47%, 48,43%, dan 38,63% pada hari kelima. Nilai tersebut secara statistik lebih tinggi dibandingkan P1 pada hari ketiga hingga kelima (P<0,05), sehingga menunjukkan bahwa kombinasi air kelapa tua sebanyak 80% dengan kuning telur 20% merupakan formulasi pengencer yang paling efektif dalam mempertahankan motilitas spermatozoa epididimis sapi Bali. Kemampuan tersebut diduga karena air kelapa mengandung glukosa, fruktosa, mineral, dan elektrolit yang berfungsi sebagai sumber energi, sedangkan kuning telur menyediakan *fosfolipid* dan *low-density lipoprotein* (LDL) yang mampu melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan selama penyimpanan pada suhu rendah (Ulu *et al.,* 2024; Hernawati *et al.,* 2024).

Sebaliknya, perlakuan P1 (AKT 90% + KT 10%) menunjukkan penurunan motilitas paling cepat, yaitu dari 68,48% pada hari pertama menjadi hanya 26,90% pada hari kelima. Hasil ini mengindikasikan bahwa proporsi kuning telur sebesar 10% belum mampu memberikan perlindungan yang optimal terhadap membran plasma spermatozoa selama penyimpanan dingin. Kerusakan membran akan mengganggu fungsi mitokondria pada bagian *midpiece*, sehingga sintesis ATP sebagai sumber energi pergerakan *flagelum* menurun dan akhirnya mengurangi motilitas spermatozoa. Penurunan kualitas tersebut merupakan fenomena yang umum terjadi selama preservasi semen cair pada suhu 4–5°C apabila perlindungan membran dan sistem antioksidan dalam pengencer tidak mencukupi (Blegur *et al.,* 2020; Prastiya *et al.,* 2022).

Perlakuan P2, P4 dan P5 menunjukkan kemampuan mempertahankan motilitas yang berada di antara P1 dan P3. Pada hari kelima, motilitas masing-masing mencapai 31,10%, 40,58%, dan 35,68%. Walaupun P4 menghasilkan motilitas akhir sedikit lebih tinggi dibandingkan P3, secara keseluruhan P3 memperlihatkan kestabilan motilitas yang lebih baik sejak hari pertama hingga hari kelima. Hal ini menunjukkan bahwa keseimbangan antara sumber energi dari air kelapa dan komponen pelindung membran dari kuning telur pada komposisi 80:20 memberikan lingkungan yang paling sesuai bagi kelangsungan hidup spermatozoa selama penyimpanan. Hasil penelitian ini sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kombinasi air kelapa dengan sekitar 20% kuning telur merupakan formulasi yang efektif dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu 5°C. Air kelapa menyediakan substrat energi berupa glukosa, fruktosa, mineral, dan antioksidan, sedangkan kuning telur berfungsi sebagai krioprotektan alami melalui kandungan fosfolipid dan lipoprotein yang melindungi membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat cold shock (Aji *et al.,* 2019;

Hernawati *et al.,* 2024; Rochmi & Sofyan, 2019). Sebaliknya, peningkatan konsentrasi kuning telur yang terlalu tinggi dilaporkan dapat meningkatkan viskositas pengencer sehingga mengurangi motilitas spermatozoa dan memperlambat perpindahan nutrien maupun proses pertukaran metabolit di sekitar sel spermatozoa, yang pada akhirnya mempercepat penurunan kualitas semen selama penyimpanan dingin (Hoesni *et al.,* 2024; Hernawati *et al.,* 2024).

Selama penyimpanan spermatozoa pada suhu 4-5°C, kualitas motilitas akan perlahan menurun. Batas standar minimal motilitas spermatozoa semen cair agar masih layak dan efektif digunakan untuk inseminasi buatan (IB) demi menjaga *conception rate* yang optimal adalah minimal 40%. Jika pada saat evaluasi sebelum IB persentase motilitasnya sudah turun di bawah 40%, semen cair tersebut dianggap sudah tidak layak pakai. Standar motilitas 40% ini sejalan dengan standar minimal motilitas pasca-thawing pada semen beku (Muhamad *et al.,* 2017; BSN., 2017). Berdasarkan rujukan tersebut maka perlakuan P4 mampu mempertahankan motilitas selama penyimpanan pada suhu 5ºC lebih baik dibanding perlakuan lainnya selama lima hari dan layak digunakan untuk IB, namun untuk memperoleh hasil IB maksimal sebaiknya digunakan penyimpanan empat hari.

Tabel 2. Motilitas, Viabilitas dan Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Epididimis Epididimis Sapi Bali Yang Disimpang Pada Suhu 5ºC

| Kualitas Spermatozoa | Perlakuan | Lama penyimpanan (hari) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Motilitas (%) | P1 | 68,48 ± 8,80$^{a}$ | 56,42 ± 2,00$^{b}$ | 45,95 ± 3,12$^{b}$ | 35,80 ± 4,19$^{b}$ | 26,90 ± 2,06$^{c}$ |
| | P2 | 70,02 ± 8,14$^{a}$ | 64,05 ± 4,84$^{a}$ | 54,05 ± 4,58$^{ab}$ | 43,53 ± 4,12$^{ab}$ | 31,10 ± 1,16$^{bc}$ |
| | P3 | 73,85 ± 6,72$^{a}$ | 65,95 ± 4,07$^{a}$ | 57,47 ± 2,57$^{a}$ | 48,43 ± 4,19$^{a}$ | 38,63 ± 6,27$^{a}$ |
| | P4 | 72,80 ± 4,50$^{a}$ | 66,35 ± 3,73$^{a}$ | 52,73 ± 9,67$^{ab}$ | 50,10 ± 3,52$^{a}$ | 40,58 ± 5,71$^{a}$ |
| | P5 | 69,52 ± 3,60$^{a}$ | 63,33 ± 1,37$^{a}$ | 50,77 ± 5,86$^{ab}$ | 42,37 ± 7,11$^{ab}$ | 35,68 ± 3,16$^{ab}$ |
| Viabilitas (%) | P1 | 76,77 ± 2,35$^{a}$ | 74,67 ± 1,83$^{a}$ | 71,13 ± 2,21$^{b}$ | 68,40 ± 1,72$^{c}$ | 65,90 ± 2,15b |
| | P2 | 77,77 ± 2,30$^{a}$ | 75,17 ± 1,90$^{a}$ | 73,38 ± 1,73$^{ab}$ | 70,45 ± 1,72$^{abc}$ | 67,47 ± 2,71$^{ab}$ |
| | P3 | 79,23 ± 2,59$^{a}$ | 77,02 ± 2,37$^{a}$ | 74,87 ± 2,09$^{a}$ | 72,80 ± 2,15$^{ab}$ | 70,33 ± 3,77$^{ab}$ |
| | P4 | 79,23 ± 2,67$^{a}$ | 76,63 ± 2,84$^{a}$ | 75,53 ± 1,57$^{a}$ | 73,37 ± 1,32$^{a}$ | 70,65 ± 2,22$^{a}$ |
| | P5 | 77,08 ± 3,82$^{a}$ | 74,98 ± 1,65$^{a}$ | 72,30 ± 1,99$^{ab}$ | 70,18 ± 1,66$^{bc}$ | 67,97 ± 2,10$^{ab}$ |
| MPU (%) | P1 | 70,18 ± 4,17$^{a}$ | 63,95 ± 2,98$^{b}$ | 57,70 ± 2,39$^{b}$ | 52,97 ± 4,72$^{a}$ | 46,07 ± 4,23$^{a}$ |
| | P2 | 73,68 ± 3,35$^{a}$ | 68,23 ± 3,51$^{ab}$ | 63,27 ± 4,18$^{a}$ | 56,73 ± 4,46$^{a}$ | 53,65 ± 4,00$^{ab}$ |
| | P3 | 75,32 ± 2,62$^{a}$ | 69,53 ± 3,36$^{a}$ | 65,02 ± 3,17$^{a}$ | 59,27 ± 3,89$^{a}$ | 55,48 ± 5,14$^{a}$ |
| | P4 | 74,10 ± 3,23$^{a}$ | 69,58 ± 3,14$^{a}$ | 64,52 ± 2,31$^{a}$ | 58,33 ± 2,80$^{a}$ | 56,12 ± 4,81$^{a}$ |
| | P5 | 71,23 ± 4,18$^{a}$ | 66,18 ± 2,66$^{ab}$ | 61,30 ± 2,10$^{ab}$ | 56,63 ± 3,78$^{a}$ | 51,58 ± 5,51$^{ab}$ |

Ket. $^{abc}$Superskrip berbeda pada kolom yang sama menunjukan perbedaan yang nyata (P<0,05)

## 2.2. Viabilitas Spermatoza Epididimis Sapi Bali

Hasil penelitian Tabel 2, menunjukan bahwa viabilitas spermatozoa epididimis sapi Bali yang disimpan pada suhu 5°C mengalami penurunan secara bertahap pada seluruh perlakuan selama lima hari penyimpanan. Pada hari pertama, viabilitas spermatozoa masih tinggi, berkisar antara 76,77% hingga 79,23%, dan tidak menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan (P>0,05). Penurunan persentase spermatozoa hidup mulai terlihat sejak hari kedua hingga hari kelima sebagai akibat dari berkurangnya cadangan energi, meningkatnya kerusakan membran plasma, serta akumulasi *reactive oxygen species* (ROS) selama penyimpanan dingin. Meskipun suhu 5°C mampu memperlambat aktivitas metabolisme spermatozoa, penyimpanan dalam jangka waktu yang lebih lama tetap menyebabkan penurunan viabilitas karena proses degenerasi sel berlangsung secara bertahap (Ervandi, 2023; Hernawati *et al.,* 2024).

Perlakuan P4 menunjukkan kemampuan terbaik dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan. Persentase spermatozoa hidup pada perlakuan ini menurun secara perlahan dari 79,23% pada hari pertama menjadi 76,63%, 75,53 %, 73,37%, dan masih

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

mencapai 70,65% pada hari kelima. Hasil tersebut merupakan yang tertinggi dibandingkan perlakuan lainnya pada akhir penyimpanan dan berbeda nyata (P<0,05) dengan perlakuan P1. Tingginya viabilitas pada P4 menunjukkan bahwa kombinasi 75% air kelapa tua dan 25% kuning telur mampu menyediakan keseimbangan antara sumber nutrien dan komponen protektif yang diperlukan untuk mempertahankan integritas membran plasma spermatozoa. Air kelapa tua menyediakan glukosa, fruktosa, asam amino, mineral, dan elektrolit sebagai substrat metabolisme, sedangkan kuning telur mengandung *fosfolipid* dan *low-density lipoprotein* (LDL) yang efektif melindungi membran spermatozoa dari kerusakan akibat *cold shock* selama penyimpanan pada suhu rendah (Ulu *et al.,* 2024; Hernawati *et al.,* 2024).

Perlakuan P3 juga mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa dengan baik hingga hari kelima, yaitu sebesar 70,33%, meskipun sedikit lebih rendah dibandingkan P4. Sedangkan perlakuan P2 dan P5 menghasilkan viabilitas akhir masing-masing 67,47% dan 67,97%, serta P1 (90% air kelapa tua + 10% kuning telur) menunjukkan viabilitas terendah, yaitu 65,90%. Hal tersebut mengindikasikan bahwa konsentrasi kuning telur sebesar 10% belum mampu memberikan perlindungan membran yang optimal terhadap pengaruh suhu rendah. Sebaliknya, peningkatan konsentrasi kuning telur hingga 20–25% terbukti mampu mempertahankan integritas membran plasma sehingga proporsi spermatozoa hidup tetap tinggi selama penyimpanan. Hasil penelitian ini sejalan dengan berbagai penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa penambahan kuning telur pada kisaran 20–25% dalam pengencer berbasis air kelapa memberikan perlindungan yang lebih efektif terhadap viabilitas spermatozoa dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah.

Tingginya viabilitas pada perlakuan P3 dan P4 erat kaitannya dengan kemampuan membran plasma mempertahankan keseimbangan osmotik dan aktivitas metabolisme sel. Membran plasma yang tetap utuh akan menjaga fungsi pompa ion, menghambat masuknya ion kalsium secara berlebihan, serta mempertahankan aktivitas mitokondria dalam menghasilkan ATP yang diperlukan untuk kelangsungan hidup spermatozoa. Sebaliknya, kerusakan membran menyebabkan meningkatnya permeabilitas sel, kebocoran komponen intraseluler, dan akhirnya mengakibatkan kematian spermatozoa. Oleh karena itu, keberadaan fosfolipid, kolesterol, dan lipoprotein dalam kuning telur berperan penting sebagai krioprotektan ekstraseluler yang mampu mempertahankan stabilitas membran selama preservasi pada suhu 5°C (Ervandi, 2023).

### 2.3. Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa Epididimis Sapi Bali

Hasil penelitian Tabel 2, menunjukkan bahwa persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa epididimis sapi Bali yang disimpan pada suhu 5°C mengalami penurunan secara bertahap pada seluruh perlakuan selama lima hari penyimpanan. Pada hari pertama, nilai MPU berkisar antara 70,18% hingga 75,32%, kemudian menurun menjadi 46,07% hingga 56,12% pada hari kelima. Penurunan tersebut menunjukkan bahwa semakin lama penyimpanan berlangsung, semakin besar kerusakan membran plasma akibat cold shock, perubahan fluiditas membran, serta peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) yang memicu peroksidasi lipid membran. Kerusakan membran plasma menyebabkan terganggunya transport ion, keseimbangan osmotik, aktivitas enzim membran, dan metabolisme sel sehingga viabilitas spermatozoa terus menurun selama penyimpanan dingin (Ervandi, 2023; Toustani *et al.,* 2021). Selain itu, stres oksidatif selama preservasi dingin merupakan penyebab utama penurunan integritas membran spermatozoa pada berbagai spesies ternak sehingga pengencer harus mampu memberikan perlindungan terhadap kerusakan lipid membran.

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada hari pertama seluruh perlakuan tidak berbeda nyata (P>0,05), namun mulai hari kedua hingga hari kelima terdapat perbedaan nyata (P<0,05) antar perlakuan. Perlakuan P3 dan P4 secara konsisten menghasilkan nilai MPU yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Pada hari kelima, P4 mempertahankan MPU sebesar 56,12%, diikuti P3 sebesar 55,48%, sedangkan nilai terendah diperoleh pada P1 yaitu 46,07%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa penambahan kuning telur sebesar 20–25% memberikan perlindungan membran plasma yang lebih efektif dibandingkan konsentrasi yang lebih rendah maupun lebih tinggi. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Ervandi *et al.,* (2023) yang melaporkan bahwa kombinasi air kelapa dan kuning telur mampu mempertahankan kualitas semen sapi Bali selama penyimpanan dingin. Demikian juga oleh Ďuračka *et al.,* (2024), yang menyatakan bahwa pengencer berbasis kuning telur lebih efektif mempertahankan motilitas dan integritas membran plasma semen sapi yang disimpan pada suhu dingin dibandingkan beberapa pengencer alternatif.

Keunggulan perlakuan P3 dan P4 diduga berkaitan dengan keseimbangan komposisi antara air kelapa tua sebagai sumber energi, elektrolit, vitamin, dan antioksidan alami dengan kuning telur sebagai *krioprotektan ekstraseluler*. Air kelapa menyediakan glukosa dan fruktosa yang mendukung metabolisme spermatozoa selama penyimpanan, sedangkan kuning telur mengandung low-density lipoprotein (LDL) dan fosfolipid yang mampu melapisi membran plasma sehingga mengurangi kehilangan fosfolipid membran, menstabilkan struktur lipid bilayer, serta menekan efek *cold shock*. LDL diketahui merupakan fraksi utama kuning telur yang bertanggung jawab terhadap unsur protektif selama penyimpanan maupun kriopreservasi spermatozoa (Tshabalala *et al.,* 2021). Sebaliknya konsentrasi kuning telur yang terlalu rendah menyebabkan perlindungan membran belum optimal, sedangkan konsentrasi yang terlalu tinggi meningkatkan viskositas pengencer sehingga menghambat difusi nutrien dan pertukaran metabolit spermatozoa.

Secara fisiologis, membran plasma merupakan struktur yang sangat menentukan keberhasilan fertilisasi karena berperan dalam mempertahankan homeostasis sel, transport ion, aktivitas enzim membran, kapasitasi, reaksi akrosom, serta fusi spermatozoa dengan oosit. Oleh karena itu, tingginya persentase MPU pada perlakuan P3 dan P4 menunjukkan bahwa formulasi pengencer yang mengandung 80–75% air kelapa tua dengan 20–25% kuning telur merupakan komposisi yang paling efektif dalam mempertahankan kualitas spermatozoa epididimis sapi Bali selama penyimpanan pada suhu 5°C. Hasil penelitian ini mendukung berbagai penelitian lainnya yang menyatakan bahwa penggunaan krioprotektan berbasis kuning telur, terutama fraksi LDL, mampu mempertahankan integritas membran plasma, viabilitas, serta kemampuan fertilisasi spermatozoa selama preservasi dingin maupun kriopreservasi pada berbagai spesies ternak (Mahiddine & Kim, 2021; Tshabalala *et al.,* 2021; Ďuračka *et al.,* 2024).

## D. KESIMPULAN

Karakteristik spermatozoa segar epididimis sapi Bali sebagai berikut: konsentrasi 2.150 *x* $10^6$ spermatozoa/ml, motilitas 76,83%, viabilitas 80,17%, abnormalitas 10,00%, butiran sitoplasma 24,00% dan MPU 81,00%. Profil penurunan kualitas spermatozoa epididimis sapi Bali selama penyimpanan pada suhu 5°C sebagai berikut: motilitas hari pertama 68,48-73,85% menjadi 26,90-40,58% pada hari kelima, viabilitas hari pertama 76,77-79,23,90% menjadi 65,90-70,65% pada hari kelima dan MPU hari pertama 70,18-75,32% menjadi 46,07-56,12% pada hari kelima. Perlakuan P4 (AKT 75% + KT 25%) dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa epididimis

sapi Bali selama lima hari penyimpanan pada suhu 5ºC dan layak digunakan dalam program inseminasi buatan (IB), namun untuk memberikan hasil IB maksimal sebaiknya menggunakan lama penyimpanan empat hari.

## E. DAFTAR PUSTAKA

Aji, R. N., Agus, A., Widyobroto, B. P., Hartatik, T., Budisatria, I. G. S., Ismaya, Fathoni, A., Kumala, S., & Bintara, S. (2019). The effect of Andromed® and coconut water + 20% egg yolk as diluent on semen motility of Belgian Blue cattle. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 387(1), 012127. https://doi.org/10.1088/1755-1315/387/1/012127

Aisah, S., Isnaini, N., & Wahjuningsih, S. (2017). Kualitas semen segar dan recovery rate sapi bali pada musim yang berbeda. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan, 27(1), 63–79. https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2017.027.01.06

Badan Standardisasi Nasional (BSN)(2017). Semen beku – Bagian 1: Sapi (SNI 4869-1:2017). Badan Standardisasi Nasional. Jakarta.

Cunha, A. T. M., Carvalho, J. O., Guimarães, A. L. S., Leme, L. O., Caixeta, F. M., Viana, J. H. M., & Dode, M. A. N. (2019). Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. PLoS ONE, 14(1), e0209692. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209692

Das, J., & Singh, M. 2022. Epididymal Spermatozoa: An Alternative Source of Male Gametes for Assisted Reproduction in Livestock. Reproduction in Domestic Animals, 57(3), 294–305.

Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. (2020). Laporan Tahunan Program Upaya Khusus Sapi Indukan Wajib Bunting (UPSUS SIWAB). Kementerian Pertanian RI. Jakarta.

Ďuračka, M., Benko, F., Kačániová, M., & Tvrdá, E. (2024). Comparative study: Efficacy of egg-yolk vs soy lecithin-based diluent in preservation of chilled bovine semen. Czech Journal of Animal Science, 69, 2024 (10): 400–409. https://doi.org/10.17221/138/2024-CJAS

Ervandi, M. (2023). Integrity of sperm cell Bali bull preserved at 5°C using a diluent formulation of red fruit extract (Pandanus conoideus Lamk) and coconut water. Journal La Lifesci, 4(6), 328–337. https://doi.org/10.37899/journallalifesci.v4i6.1191

Ervandi, M., Makoolang, S., Ardiansyah, W., & Ananda, S. (2023). Efektivitas kombinasi ekstrak buah merah (Pandanus conoideus Lam.) dan air kelapa hijau terhadap kualitas semen sapi Bali selama simpan dingin. Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan, 9(2), 161–176. https://doi.org/10.24252/jiip.v9i2.40465

Fafandri, F., Sumardani, N. L. G., & Suberata, I. W. (2023). Kualitas semen beku sapi bali pasca thawing dalam waktu berbeda. Jurnal Nukleus Peternakan, 10(2), 52–59. https://doi.org/10.35508/nukleus.v10i2.11176

Hernawati, T., Susilowati, S., Suprayogi, T.W., Lokapirnasari, W.P. & Rosyada, Z.N.A., 2024. Coconut water combined with purebred chicken egg yolk as an alternative extender for Pote buck semen. Ovozoa: Journal of Animal Reproduction. 13: 96-104. https://e-journal.unair.ac.id/OVZ/index

Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. Reproductive Biomedicine Online, 37(3), 327–339.

Hoesni, F., Firmansyah, F., Abutani, S.A. and Nurhayati, N. 2024. The Effects of Adding Coconut Water to Egg Yolk Diluent on Motility, Viability, and Abnormality of Etawa

Crossbred Goat Sperm. World's Veterinary Journal 14(2): 202-212. https://dx.doi.org/10.54203/scil.2024.wvj25

Jean W. H.Y., Liya G, Yan F.N. and Swee N.T. 2009. The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (Cocos nucifera L.) Water. Molecules, 14: 5144-5164.

Indriastuti, R., Ulum, M.F., Arifiantini, R.I., & Purwantara, B. (2020). Individual variation in fresh and frozen semen of Bali bulls (Bos sondaicus). Veterinary World, 13(5), 840–846.

Khairani, R., Hidayat, M., & Fitriani, E. 2023. Coconut Water-Based Extender Improves Motility and Viability of Bovine Sperm During Chilled Storage. Veterinary World, 16(2), 395–402.

Mahiddine, F. Y., & Kim, M.J. (2021). Overview on the antioxidants, egg yolk alternatives, and mesenchymal stem cells and derivatives used in sperm cryopreservation. Animals, 11(7), 1930. https://doi.org/10.3390/ani11071930

Muhammad, D., Susilawati, T., & Wahjuningsih, S. (2017). Pengaruh penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi FH kualitas rendah selama penyimpanan suhu 4-5 °C. Jurnal Ternak Tropika, 17(1), 66-76.

Prastowo, S., Dharmawan, P., Nugroho, T., Bachtiar, A., Lutojo, & Pramono, A. (2018). Kualitas semen segar sapi Bali (Bos javanicus) pada kelompok umur yang berbeda. Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner, 23(1), 1–10.

Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. Anim. Reprod. Sci. 36:77-86.

Rochmi, S. E., & Sofyan, M. S. (2019). A diluent containing coconut water, fructose, and chicken egg yolk increases rooster sperm quality at 5°C. Veterinary World, 12(7), 1116–1120. https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1116-1120

Rindengan, B., & Novarianto, H. 2015. Kelapa: Peranan, Pengolahan, dan Produk Turunannya. Balai Penelitian Tanaman Palma. Jakarta.

Sawitri, N. M., Susilawati, T., Wahjuningsih, S., & Pangestu, M. (2021). Comparison of coconut water, tris-based egg yolk, and AndroMed® extenders on cryopreserved Bali bull semen. International Journal of Veterinary Science, 10(4), 328–334.

Sudarman, U., Surbakti, S., & Piliang, W. G. (2021). Pemanfaatan Air Kelapa Tua sebagai Pengencer Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 5ºC. Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia, 11(2), 121-130.

Susilawati, T. 2019. Inseminasi buatan dan teknologi reproduksi ternak. Universitas Brawijaya Press. Malang.

Tethool, A. N. (2023). Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi Bali pada kelompok umur yang berbeda. *Jambura Journal of Animal Science, 5*(2), 64–71.

Toustani, R.R., Ali Mehr, M.R & Mojdehi, R.M. 2021. Reduction of seminal plasma concentration can decrease cold-shock damage during storage at 5°C. Anim Reprod. 18 (1): 1-12. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0211

Tshabalala, M. M., Mphaphathi, M. L., Nephawe, K. A., Pilane, C. M., & Nedambale, T. L. (2021). Study the effect of extracted low-density lipoprotein from egg yolk on the cryopreservation of Nguni bull semen. American Journal of Animal and Veterinary Sciences.

Ulu, K. F., Belli, H. L. L., Riwu, A. R., & Hine, T. M. (2024). Pengaruh penggunaan tiga jenis kuning telur dalam pengencer air kelapa muda terhadap kualitas semen sapi Bali. Jurnal Nukleus Peternakan, 11(2), 148–158. https://doi.org/10.35508/nukleus.v11i2.7797

Wattimena, J., F. Parera dan M. Veerman. 2009. Effect Of Maltose Concentration in Tris Dilution

*ISSN: 2722-6964 (online)* *DOI: https://doi.org/10.30598/kasav7i2p25-35*

on Epididymal Spermatozoa Quality of Bali Bull Preserved at 5ºC. Jurnal Indonesian Tropical Animal Agriculture. 34(4). 272-278

Yuli, A.T & Peni, W.P. 2020. Prosedur Rancangan Percobaan Untuk Bidang Peternakan. UI Publishing. Jakarta.