

Pengaruh Penambahan Filtrat Biji Kelor Dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Brahman

Effect of Moringa Seed Filtrate Addition in Tris Citric Egg Yolk Diluent on Brahman Cattle Spermatozoa Quality

Arif Rahmansyah*, Dyah Hariani

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

*e-mail: arif.rahmansyah90@gmail.com

Abstrak. Peningkatan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) selama pembekuan dalam nitrogen cair bersuhu -196°C mengakibatkan membran plasma spermatozoa mengalami peroksidasi lipid sehingga perlu dilakukan penambahan sumber antioksidan alami, salah satunya yaitu Filtrat Biji Kelor (FBK). Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh penambahan FBK yang optimal dalam pengencer Tris Kuning Telur Sitrat (TKTS) dalam mempertahankan kualitas spermatozoa Sapi Brahman sebelum dan sesudah pembekuan. Desain penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 5 perlakuan dan 4 pengulangan yaitu P0 (Tanpa Penambahan FBK); P1 (Penambahan 1,5% FBK); P2 (Penambahan 3,0% FBK); P3 (Penambahan 4,5% FBK); dan P4 (Penambahan 6,0% FBK). Parameter yang diukur yaitu motilitas spermatozoa berdasarkan gerakan individu, viabilitas berdasarkan jumlah spermatozoa hidup dengan pewarnaan *eosin-negrosin*, dan integritas membran berdasarkan jumlah spermatozoa yang memiliki membran utuh (ekor lurus) dengan *Hypoosmotic Swelling Test*. Data diuji normalitas dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*, uji Anava satu arah, dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan terdapat pengaruh nyata pemberian FBK dalam pengencer TKTS terhadap kualitas spermatozoa sapi Brahman ($P < 0,01$). Penambahan 4,5% FBK yang merupakan dosis optimal menghasilkan persentase rata-rata motilitas sesudah pembekuan sebesar $35,75 \pm 3,27\%$, persentase rata-rata viabilitas $57,75 \pm 0,43\%$; dan persentase rata-rata integritas membran sebesar $53,75 \pm 0,43\%$. Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa penambahan 4,5% FBK dalam pengencer TKTS merupakan dosis yang optimal.

Kata kunci: peroksidasi lipid; antioksidan; membran plasma spermatozoa; motilitas; viabilitas; integritas membran.

Abstract. Increased production of *Reactive Oxygen Species* (ROS) during freezing in liquid nitrogen at a temperature of -196°C causes the plasma membrane of spermatozoa to undergo lipid peroxidation, so it is necessary to add natural antioxidant sources, one of which is Moringa seed filtrate. This study aims to determine the effect of optimal addition of Moringa seed filtrate in Tris Egg Yolk Citrate diluent to maintaining the quality of Brahman cattle spermatozoa before and after freezing. The design of this study was a completely randomized design with 5 treatments and 4 repetitions, namely P0 (Without Addition of Moringa seed filtrate); P1 (Addition of 1.5% Moringa seed filtrate); P2 (Addition of 3.0% Moringa seed filtrate); P3 (Addition of 4.5% Moringa seed filtrate); and P4 (Addition of 6.0% Moringa seed filtrate). The parameters measured were spermatozoa motility based on individual movements, viability based on the number of live spermatozoa with *eosin-negrosin* staining, and membrane integrity based on the number of spermatozoa with intact membranes (straight tails) using the *Hypoosmotic Swelling Test*. The data were tested for normality using the *Kolmogorov-Smirnov*, one-way Anova, and Duncan's. The results showed that there was a significant effect of giving FBK in TKTS diluent to the sperm quality of Brahman cattle ($P < 0.01$). The addition of 4.5% FBK resulted in optimal spermatozoa motility after freezing of $35,75 \pm 3,27\%$, optimal viability of $57,75 \pm 0,43\%$; and the optimal membrane integrity of $53,75 \pm 0,43\%$. Based on the results of the study, it could be concluded that the addition of 4.5% FBK in TKTS diluent was the most optimal dose.

Key words: lipid peroxidation; antioxidant; spermatozoa plasma membrane; motility; viability; membrane integrity

PENDAHULUAN

Kebutuhan gizi protein hewani berasal dari daging sapi di Indonesia terus meningkat sebesar 0,261 kg pada 2014; 0,417 kg pada 2015; 0,419 kg pada 2016; 0,496 kg pada 2017; dan 0,497 kg pada 2018 (Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian RI, 2019). Hal tersebut mengharuskan adanya peningkatan jumlah populasi sapi potong di Indonesia. Sapi Brahman merupakan salah satu jenis sapi potong yang sudah dikenal oleh masyarakat Indonesia dan merupakan keturunan sapi Zebu (*Bos indicus*) yang dapat bertahan hidup di daerah beriklim tropis seperti Amerika Serikat, Australia, New Zealand, dan Indonesia (Novita dkk., 2019). Pemerintah berupaya mengembangkan bioteknologi reproduksi ternak berupa Inseminasi Buatan (IB) untuk meningkatkan jumlah dan mutu genetik sapi potong di Indonesia (Feradis, 2010).

IB merupakan proses memasukkan semen ke dalam saluran kelamin ternak betina saat mengalami estrus dengan menggunakan *Artificial Insemination gun* (AI gun) sehingga diharapkan ternak betina bunting dan melahirkan anak (Widjaja dkk., 2017). Keberhasilan IB dipengaruhi oleh 4 faktor, yakni keterampilan inseminator, pengetahuan zooteknik inseminator, kesuburan ternak betina, dan kualitas semen yang digunakan (Toelihere, 2006). Semen yang digunakan dapat berbentuk cair ataupun beku. Semen beku lebih banyak digunakan karena memungkinkan untuk pengawetan dalam jangka waktu yang tidak terbatas (Futino dkk., 2010). Kualitas semen beku dipengaruhi oleh 4 faktor, yakni kondisi saat penampungan semen segar, pengenceran, ekuilibrasi, dan pembekuan (Savitri dkk., 2014). Selama proses penyimpanan dalam nitrogen cair bersuhu -196°C spermatozoa mengalami penurunan kualitas akibat berubahnya suhu dan osmolaritas sehingga memicu terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas (Nebel, 2007; Moore dkk., 2005). Radikal bebas dapat menyebabkan rusaknya membran plasma spermatozoa yang kaya asam lemak tak jenuh atau lipid disebut sebagai peristiwa peroksidasi lipid (Pamungkas dan Krisnan, 2017). Peroksidasi lipid yang meluas menimbulkan kerusakan oksidatif yang masif terhadap ikatan kovalen antar karbon pada lapisan fosfolipid bilayer membran plasma spermatozoa (Gogol dan Wierzechos-Hilczer, 2009; Ogbuwu dkk., 2010). Upaya yang bisa diaplikasikan untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah dengan menambahkan media pengencer yang berguna juga untuk memperbanyak volume semen, sebagai nutrisi dan krioprotektan spermatozoa (Hardijanto dkk., 2010).

Pengencer harus mengandung unsur kimia dan fisika yang mirip dengan semen, memiliki daya preservasi tinggi, dapat mempertahankan daya fertilisasi spermatozoa, dan tidak bersifat toksik terhadap spermatozoa (Susilawati, 2011). Tris kuning telur sitrat merupakan salah satu pengencer yang umum digunakan dan mengandung *anti-cold shock* berupa lesitin dan *low density lipoprotein* (Bergeron dkk., 2007), krioprotektan berupa gliserol, dan sumber energi berupa glukosa (Setiono dkk., 2015). Kekurangan pada pengencer tris kuning telur sitrat adalah minimnya kandungan antioksidan sebagai penangkal radikal bebas dan anti-peroksidasi lipid karena kuning telur hanya mengandung protein mirip *glutathion peroxidase* (GPx) dan *superoksida dismutase* (SOD) yang berperan sebatas menunjang kemampuan antioksidan (Mann dan Mann, 2008). Antioksidan merupakan senyawa pereduksi radikal bebas yang dapat mengurangi kerusakan lipid, protein, dan karbohidrat (Sari, 2016). Bentuk antioksidan ada dua yaitu sintetik dan alami. Namun, antioksidan sintetik di jual dengan harga relatif tinggi, sedangkan antioksidan alami melimpah di alam seperti pada tumbuhan kelor (Winarsi, 2007).

Tumbuhan kelor (*Moringa oleifera*) merupakan salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa antioksidan alami (Azizah, 2020). Organ tumbuhan kelor yang sering dimanfaatkan masyarakat adalah daun sebesar 55%, buah 21%, batang 14%, dan akar 10% (Bahriyah dkk., 2015). Di dalam buah kelor terdapat biji yang bisa dimanfaatkan sebagai penjernih air (Ariyatun dkk., 2018), minyak nabati untuk kesehatan (Sudaryanto dkk., 2016), dan bahan tambahan pengencer semen (Hariadi, 2018; Nanik, 2018). Pemanfaatan biji kelor saat ini masih terbatas padahal jumlahnya berlimpah di alam. Biji kelor memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami (Sudaryanto dkk., 2016). Salah satu olahan biji kelor yang mudah ditemukan di pasaran adalah tepung biji kelor. Tepung biji kelor mengandung karbohidrat sebesar 14,98%, protein 44,23%, dan lemak 36,54% (Sakinah dkk., 2019) serta telah dilaporkan positif mengandung senyawa antioksidan berupa flavonoid sebesar 0,05 % per gram (Lalus dkk., 2021). Flavonoid dapat berfungsi sebagai senyawa pereduksi radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Wulandari dkk., 2016). Aktivitas antioksidan biji kelor yang telah dibuktikan melalui uji DPPH dengan nilai IC_{50} menunjukkan hasil sebesar $36.184 \pm 2.582 \mu\text{g}/\text{mL}$ (AAI=1,10) dan $45.378 \pm 3.705 \mu\text{g}/\text{mL}$ (AAI=0,88) sehingga biji kelor dapat dikategorikan sebagai antioksidan lemah (Laha, 2018).

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa semen kambing kacang yang disimpan selama 4 hari pada suhu 5°C dalam pengencer tris kuning telur sitrat dengan penambahan ekstrak biji kelor sebesar 4% dapat menghasilkan motilitas $52,00 \pm 2,74\%$ dan viabilitas $81,20 \pm 3,31\%$ (Hariadi, 2018). Penelitian sejenis juga dilakukan oleh (Nanik, 2018) yang melaporkan bahwa penambahan filtrat biji kelor sebesar 2% dapat menghasilkan motilitas $51,00 \pm 4,18\%$ dan viabilitas $76,40 \pm 3,65\%$. Apabila dibandingkan dengan penambahan sumber antioksidan alami lain pada pengencer yang berbasis kuning telur seperti ekstrak kulit buah naga sebesar 0,5% hanya menghasilkan motilitas sebesar $26,00 \pm 6,51\%$ dan viabilitas $74,6 \pm 6,61\%$ (Siswandoko dkk., 2017); sari buah melon 80% hanya menghasilkan motilitas sebesar $47,33 \pm 0,81\%$ dan viabilitas $57,00 \pm 1,26\%$ (Riyadhi dkk., 2017); dan sari buah tomat 20% hanya menghasilkan motilitas sebesar $48,20 \pm 14,68\%$ dan viabilitas $62,40 \pm 13,90\%$ (Rosmaidar dkk., 2013) sehingga penambahan biji kelor menunjukkan hasil yang lebih baik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa daripada penambahan sumber antioksidan lain meskipun terdapat perbedaan ternak, komposisi pengencer, dan lama penyimpanan yang digunakan.

Penambahan filtrat biji kelor dalam pengencer tris kuning telur sitrat untuk mempertahankan kualitas semen Sapi Brahman sebelum dan sesudah pembekuan merupakan penelitian pengembangan, hingga saat ini belum banyak yang meneliti dan hal inilah yang menjadi *novelty* dari penelitian ini. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh penambahan filtrat biji kelor dalam pengencer tris kuning telur sitrat dalam penyimpanan semen Sapi Brahman pada suhu -196°C sehingga dapat menghasilkan kualitas spermatozoa yang optimal dengan tolok ukur persentase motilitas, viabilitas, dan integritas membran yang diamati sebelum dan sesudah pembekuan.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari–Maret 2022 di Laboratorium Uji Mutu Semen Balai Inseminasi Buatan Ungaran, Kelurahan Sidomulyo, Kecamatan Ungaran, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 perlakuan dosis Filtrat Biji Kelor (FBK) dan 4 pengulangan pada pengencer Tris Kuning Telur Sitrat (TKTS), yaitu P0 (Tanpa Penambahan FBK); P1 (Penambahan 1,5% FBK); P2 (Penambahan 3,0% FBK); P3 (Penambahan 4,5% FBK); dan P4 (Penambahan 6,0% FBK) yang diulang sebanyak 4 kali.

Pembuatan pengencer TKTS mengacu pada prosedur Setiadi dkk. (2006) yang sedikit dimodifikasi, proses diawali dengan menghomogenkan 2,96 g *Tris base* (Bio World), 1,65 g asam sitrat monohidrat (Merck, Germany), 0,1 g penisilin-G (Meiji, Japan), 0,1 g streptomycin (Meiji, Japan), dan 100 mL *deionized water steril* (IKA) dalam gelas *Beaker* ukuran 500 mL (Schot Durran) yang dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Kemudian ditambahkan 10 mL kuning telur sebagai pengencer fase A yang akan ditambahkan pada suhu 37°C dalam *water bath* kemudian disimpan selama 24 jam dalam refrigerator bersuhu 5°C dan disisihkan sebanyak 21 mL untuk ditambahkan 4 mL Glycerol (Emsure, Germany) sebagai pengencer fase B yang akan ditambahkan pada suhu 5°C dalam *cool top* kemudian disimpan selama 24 jam dalam refrigerator bersuhu 5°C.

Pembuatan FBK diawali dengan menghomogenkan 100 g tepung biji kelor dan 100 mL *deionized water steril* (IKA) dalam gelas *Beaker* ukuran 500 mL (Schot Durran) menggunakan *magnetic stirrer* kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm menggunakan suhu ruang (27°C). Supernatan yang terbentuk diambil dengan spuit 5 mL (*one med*) dan difiltrasi dengan *miliphore* ukuran 0,42 μm dan 0,22 μm (Sartorius stedim) dan disaring menggunakan kertas saring ukuran 90 mm (Whatman). Mengukur derajat keasaman (pH) sebesar 6,4-7,8 sesuai kisaran pH spermatozoa sapi menggunakan kertas lakmus yang dicocokkan dengan warna acuan standar kemudian dilakukan pasteurisasi dalam air bersuhu 60°C selama 3 menit dan disimpan 1x24 jam dalam refrigerator bersuhu 5°C (Husin dkk., 2007).

Semen segar Sapi Brahman hasil penampungan diperoleh dari pejantan bernama Brahmana dengan kode pejantan 41014, berumur ± 10 tahun dengan bobot ± 600 kg di BIB Ungaran. Penampungan dilakukan seminggu sekali pada pagi hari dengan menggunakan *Artificial Vagina* (AV) kemudian diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis dengan mikroskop fase kontras serta TV monitor. Semen segar dapat diproses untuk pengenceran apabila memiliki persentase motilitas individu minimum sebesar 70% (Badan Standarisasi Nasional, 2017). Selama pemeriksaan dan sesudahnya, semen segar harus berada dalam *waterbath* dengan suhu 37°C

Pengenceran diawali dengan mencampurkan pengencer Tris Kuning Telur Sitrat (TKTS) dengan Filtrat Biji Kelor (FBK) sebanyak 1,5%(P1); 3,0%(P2); 4,5%(P3); dan 6,0%(P4) dan 4 pengulangan untuk tiap perlakuan pada suhu ruang (27°C) kedalam *Erlenmeyer* 50 ml (Iwaki)

kemudian diletakkan di dalam *waterbath* bersuhu 27°C. Kemudian semen segar dicampurkan ke dalam media pencencer dan diletakkan kembali pada *waterbath* bersuhu 37°C. Penghitungan kebutuhan pengencer didapatkan melalui alat Spektro Photometer (Balai Inseminasi Buatan Ungaran, 2011). Proses pengenceran semen dilakukan dalam 2 fase yakni Fase A (24 mL pengencer TKTS) yang dilakukan pada suhu 37°C dalam *water bath* kemudian disimpan selama 45 menit dalam refrigerator bersuhu 5°C untuk meminimalisir terjadinya *cold shock* akibat penurunan suhu yang drastis dengan metode *water jacket* dan Fase B (21 mL pengencer TKTS + 4 mL gliserol) yang dilakukan pada suhu 5°C dalam *cool top*, kemudian disimpan selama 24 jam dalam refrigerator bersuhu 5°C. Kemudian diperiksa motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa sebagai indikator *Before Freezing* (BF).

Proses *filling, sealing, and printing* merupakan proses pengemasan seluruh sampel ke dalam *straw* 0,25 mL berwarna biru muda untuk menunjukkan jenis sapi Brahman dan pemberian identitas pada *straw* berupa jenis pejantan, nama pejantan, kode pejantan, dan kode perlakuan. Proses ini dilakukan menggunakan alat yang bekerja secara otomatis dengan cara memasukkan semen cair kedalam *straw* dan menutup ujung *straw* dengan sumbat lab yang dilakukan dalam *cool top* bersuhu 5°C.

Sampel yang telah dikemas kemudian ditata pada rak hitung untuk dibekukan dalam 2 tahap yakni menggunakan uap nitrogen bersuhu -140°C dan perendaman kedalam *storage container* yang berisi nitrogen cair bersuhu -196°C. Setelah dibekukan, dilakukan *sampling* tiap perlakuan untuk diperiksa motilitas, viabilitas, dan integritas membran sebagai indikator *Post Thawing Motility* (PTM) dalam *waterbath* bersuhu 37°C selama 30 detik untuk tiap perlakuan. Persentase motilitas individu minimum PTM sebesar 40% dan motilitas massa minimum yakni ++ (Badan Standarisasi Nasional, 2017; Priyanto dkk., 2015).

Penghitungan persentase motilitas individu dilakukan oleh 2 orang estimator dengan meneteskan sampel sperma sapi Brahman yang telah diencerkan dan ditambah FBK 0%; 1,5%; 3,0%; 4,5%; dan 6,0% pada *object glass*, kemudian ditutup *cover glass* dan diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x di atas *thermal plate* bersuhu 37°C (Ducha, 2018). Pembuatan preparat uji viabilitas dilakukan menggunakan teknik pewarnaan eosin-negrosin yang dicampur sampel (4:1) dan dioleskan pada *object glass* dengan kemiringan 45° lalu dikeringanginkan. Penghitungan persentase viabilitas menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x untuk mengamati spermatozoa hidup dan tidak menyerap warna lalu dibagi dengan jumlah keseluruhan (minimal 200 ekor spermatozoa) dan dikalikan 100% (Rumende dkk., 2017). Penghitungan persentase integritas membran dilakukan dengan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS Test) untuk mengetahui keutuhan membran plasma (MPU) mengacu prosedur Purwoistri dkk. (2013) yang sedikit dimodifikasi dengan melarutkan sampel ke dalam larutan hipoosmotik (1:10) yang dibuat dengan menghomogenkan 1,3g fruktosa (Sigma, USA) dan 0,7g asam sitrat (Sigma, USA) ke dalam 100 mL aquades steril (Mili-Q-Water) selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, *object glass* berisi semen ditutup dengan *cover glass* yang selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang memiliki membran normal akan menunjukkan ekor spermatozoa melingkar, sedangkan membran yang rusak menunjukkan ekor lurus (Hidayat dkk., 2018).

Data motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa yang telah diperoleh akan ditransformasi kedalam archin dan dianalisis menggunakan program SPSS untuk dilakukan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitas data, kemudian dilakukan uji Anava satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh dari tiap perlakuan, dan uji Duncan untuk mengetahui tingkat signifikansi kualitas spermatozoa yang diberi pengencer TKTS dengan penambahan FBK sebelum dan sesudah pembekuan.

HASIL

Berdasarkan data yang telah diperoleh, didapatkan hasil penampungan semen segar Sapi Brahman dengan volume sebesar 6,5 mL; pH 6,4; berwarna krem; konsistensi sedang-kental; konsentrasi $2.128 \pm 131,22$ juta sel/mL; motilitas massa ++; dan motilitas individu sebesar 70% sehingga dapat dikategorikan semen segar dalam kondisi normal, layak dilanjutkan ke tahap pengenceran dan pembekuan karena telah memenuhi standar motilitas minimum SNI 4869:1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semen sapi Brahman yang diencerkan dengan pengencer TKTS yang ditambah FBK 0-6% sebelum pembekuan menunjukkan persentase rata-rata motilitas terendah sebesar $22,75 \pm 1,92\%$ (perlakuan TKTS + 6,0% FBK) dan persentase rata-rata motilitas tertinggi sebesar $44,00 \pm 0,71\%$ (perlakuan TKTS + 4,5% FBK), sedangkan sesudah

pembekuan menghasilkan motilitas terendah sebesar $3,25 \pm 1,09\%$ pada perlakuan TKTS + 6,0% FBK dan motilitas tertinggi sebesar $36,25 \pm 1,64\%$ pada perlakuan TKTS + 0% FBK. Penurunan motilitas antara sebelum dan sesudah pembekuan terbesar adalah 19,50% (perlakuan TKTS + 6,0% FBK) sedangkan penurunan terkecil adalah 6,00% (perlakuan TKTS + 0% FBK) (**Tabel 1**).

Tabel 1. Hasil persentase rata-rata \pm SD motilitas spermatozoa Sapi Brahman dengan penambahan FBK dalam pengencer TKTS sebelum dan sesudah pembekuan.

Perlakuan	Rata-rata motilitas (%) \pm SD		
	Sebelum pembekuan	Sesudah pembekuan	Penurunan
TKTS + 0%FBK	42,25 \pm 1,48 ^c	36,25 \pm 1,64 ^c	6,00%
TKTS + 1,5% FBK	29,25 \pm 0,43 ^b	22,00 \pm 1,58 ^b	7,25%
TKTS + 3,0% FBK	29,75 \pm 0,43 ^b	23,25 \pm 1,79 ^b	6,50%
TKTS + 4,5% FBK	44,00 \pm 0,71 ^c	35,75 \pm 3,27 ^c	8,25%
TKTS + 6,0% FBK	22,75 \pm 1,92 ^a	3,25 \pm 1,09 ^a	19,50%

Keterangan: Notasi subskrip pada kolom yang sama menunjukkan bahwa perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$); TKTS=Tris Kuning Telur Sitrak; FBK=Filtrat Biji Kelor.

Berdasarkan uji Anava satu arah didapatkan hasil bahwa penambahan FBK dalam pengencer TKTS berpengaruh nyata terhadap persentase rata-rata motilitas spermatozoa sapi Brahman ($P < 0,05$). Persentase rata-rata motilitas optimal ditunjukkan oleh perlakuan TKTS + FBK 4,5% sebelum pembekuan sebesar $44,00 \pm 0,71\%$ dan sesudah pembekuan sebesar $35,75 \pm 3,27\%$ dengan penurunan sebesar 8,25%. Selanjutnya penambahan 6,0% FBK dalam pengencer TKTS mengakibatkan penurunan persentase rata-rata motilitas secara drastis baik sebelum maupun sesudah pembekuan sehingga secara keseluruhan terjadi penurunan persentase rata-rata motilitas antara sebelum dan sesudah pembekuan sebesar 6,0-19,5% (Tabel 1).

Hasil pemeriksaan semen beku sapi Brahman dengan pengencer TKTS yang ditambah FBK 0-6% sesudah pembekuan menunjukkan persentase rata-rata viabilitas terendah sebesar $49,75 \pm 1,30\%$ dan tertinggi sebesar $56,75 \pm 1,09\%$. Penambahan FBK dari 1,5% sampai dengan 4,5% menunjukkan penurunan persentase rata-rata motilitas antara sebelum dan sesudah pembekuan yang semakin mengecil, namun dengan penambahan FBK 6% kembali terjadi penurunan persentase rata-rata viabilitas spermatozoa yang membesar (Tabel 2).

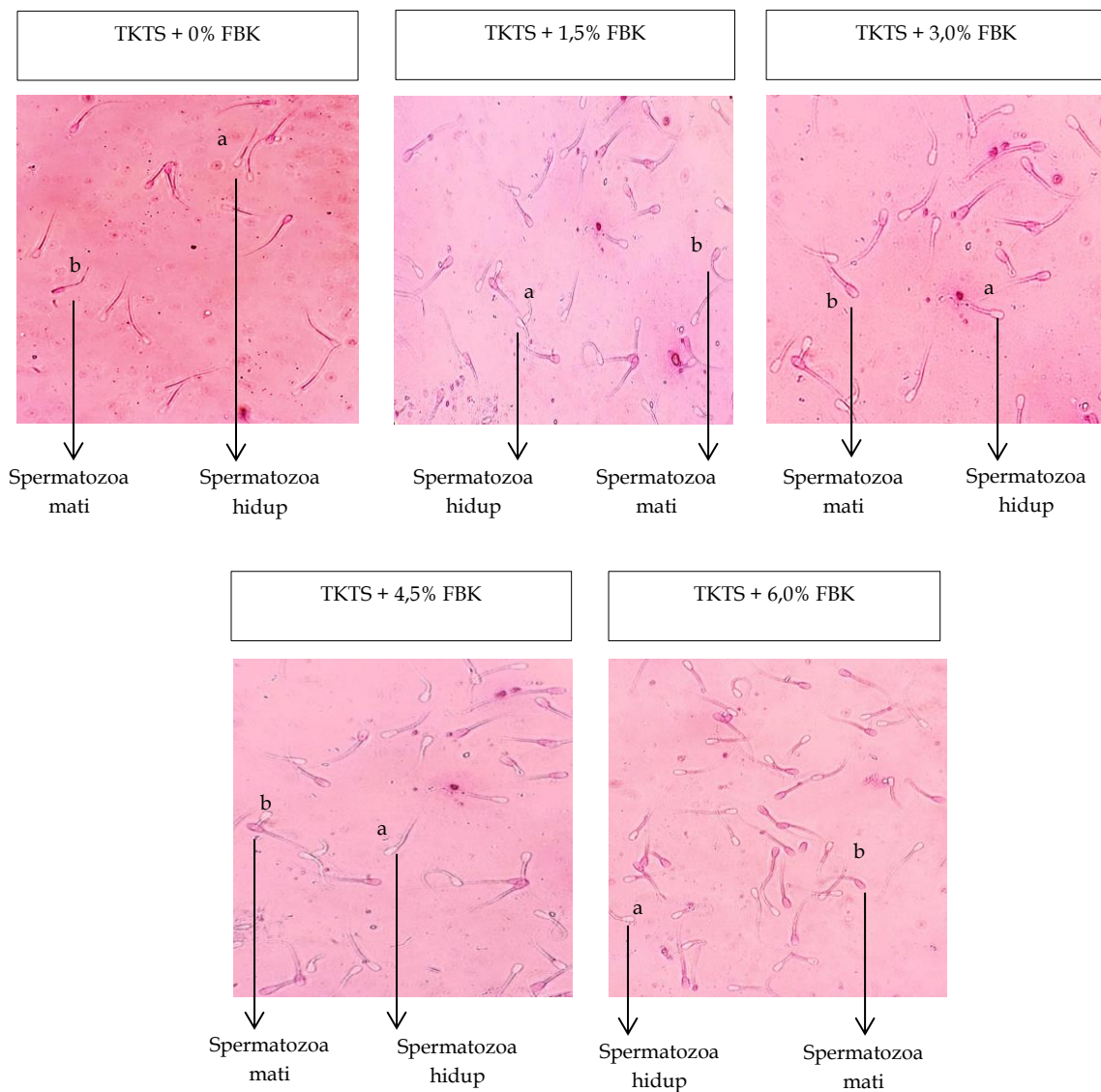
Tabel 2. Hasil persentase rata-rata \pm SD viabilitas spermatozoa Sapi Brahman dengan penambahan FBK dalam pengencer TKTS sebelum dan sesudah pembekuan.

Perlakuan	Rata-rata viabilitas (%) \pm SD		
	Sebelum pembekuan	Sesudah pembekuan	Penurunan
TKTS + 0%FBK	71,00 \pm 1,87 ^a	49,75 \pm 1,30 ^a	21,25%
TKTS + 1,5% FBK	72,75 \pm 1,09 ^{ab}	50,75 \pm 1,92 ^a	22,00%
TKTS + 3,0% FBK	73,75 \pm 0,83 ^b	52,50 \pm 3,20 ^a	21,00%
TKTS + 4,5% FBK	77,75 \pm 0,43 ^c	56,75 \pm 1,09 ^b	21,00%
TKTS + 6,0% FBK	74,25 \pm 0,83 ^b	51,50 \pm 2,29 ^a	22,75%

Keterangan: Notasi subskrip pada kolom yang sama menunjukkan bahwa perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$); TKTS=Tris Kuning Telur Sitrak; FBK=Filtrat Biji Kelor.

Berdasarkan Tabel 2 memperlihatkan bahwa penambahan FBK dalam pengencer TKTS berpengaruh sangat nyata terhadap persentase rata-rata viabilitas spermatozoa sapi Brahman ($P < 0,01$). Semen yang ditambahkan pengencer TKTS + FBK 4,5% memperlihatkan penurunan persentase rata-rata viabilitas antara sebelum dan sesudah pembekuan yang semakin mengecil baik sebelum dan sesudah pembekuan yaitu sebesar $77,75 \pm 0,43\%$ dan $56,75 \pm 1,09\%$ dengan penurunan sebesar 21,00% sehingga hasilnya lebih tinggi dari perlakuan lain dan merupakan dosis optimal ($P < 0,05$). Selanjutnya penambahan 6,0% FBK dalam pengencer TKTS mengakibatkan penurunan persentase rata-rata viabilitas baik sebelum dan sesudah pembekuan. Secara keseluruhan terjadi penurunan persentase rata-rata viabilitas dari semua perlakuan baik sebelum dan sesudah pembekuan sebesar 21,00-22,00% (Tabel 2).

Berdasarkan hasil pengamatan preparat spermatozoa diberi pewarna eosin-negrosin pada Gambar 1 memperlihatkan bahwa penambahan FBK 4,5% dalam pengencer TKTS menunjukkan jumlah spermatozoa yang hidup (berwarna bening) lebih banyak daripada spermatozoa yang mati (menyerap warna merah) dibandingkan dengan perlakuan lain dengan penambahan FBK 0%, 1,5%, 3,0%, dan 6,0%.



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa setelah pembekuan dengan perbesaran 400x. Keterangan: (a) spermatozoa hidup; (b) spermatozoa mati; P0=TKTS + 0% FBK, P1=TKTS + 1,5%FBK, P2=TKTS + 3,0%FBK, P3=TKTS + 4,5%FBK, P4=TKTS + 6,0%FBK; TKTS=Tris Kuning Telur; FBK=Filtrat Biji Kelor.

Hasil pengamatan semen beku sapi Brahman dengan pengencer TKTS yang ditambah FBK 0-6% menghasilkan persentase rata-rata integritas membran spermatozoa secara keseluruhan sebelum pembekuan hasil terendahnya sebesar $68,00 \pm 0,71\%$ dan tertinggi sebesar $74,75 \pm 0,43\%$, sedangkan sesudah pembekuan terendah sebesar $43,50 \pm 5,32\%$ dan tertinggi sebesar $54,50 \pm 1,50\%$. Penambahan FBK dari 1,5-4,5% menunjukkan penurunan persentase rata-rata integritas membran antara sebelum dan sesudah pembekuan yang semakin mengecil, namun dengan penambahan FBK 6% terjadi penurunan integritas membran spermatozoa yang semakin membesar (Tabel 3).

Penambahan FBK dalam pengencer TKTS berpengaruh nyata terhadap persentase rata-rata integritas membran spermatozoa sapi Brahman ($P < 0,05$) (Tabel 3). Penambahan FBK yang optimal dalam pengencer TKTS ditunjukkan oleh penambahan FBK 4,5% yang menghasilkan persentase rata-rata integritas membran spermatozoa sebelum pembekuan sebesar $74,75 \pm 0,43\%$ dan sesudah pembekuan sebesar $54,50 \pm 1,50\%$ dengan penurunan sebesar 20,25%. Selanjutnya penambahan 6,0% FBK dalam pengencer TKTS mengakibatkan penurunan persentase rata-rata integritas membran spermatozoa yang semakin membesar baik sebelum dan sesudah pembekuan. Secara keseluruhan terjadi penurunan persentase rata-rata integritas membran spermatozoa antara sebelum dan sesudah pembekuan pada semua perlakuan sebesar 20,25 - 24,50%.

Tabel 3. Hasil rata-rata \pm SD persentase integritas membran spermatozoa Sapi Brahman dengan penambahan FBK dalam pengencer TKTS sebelum dan sesudah pembekuan.

Perlakuan	Rata-rata integritas membran (%) \pm SD		
	Sebelum pembekuan	Sesudah pembekuan	Penurunan
TKTS + 0%FBK	68,00 \pm 0,71 ^a	43,50 \pm 5,32 ^a	24,50%
TKTS + 1,5% FBK	68,75 \pm 0,83 ^{ab}	45,75 \pm 5,26 ^b	23,00%
TKTS + 3,0% FBK	70,00 \pm 0,71 ^{bc}	49,75 \pm 3,19 ^{ab}	20,25%
TKTS + 4,5% FBK	74,75 \pm 0,43 ^d	54,50 \pm 1,50 ^b	20,25%
TKTS + 6,0% FBK	70,75 \pm 1,30 ^c	49,75 \pm 2,17 ^{ab}	21,00%

Keterangan: Notasi subskrip pada kolom yang sama menunjukkan bahwa perlakuan memberikan hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$); TKTS=Tris Kuning Telur Sitrak; FBK=Filtrat Biji Kelor.

PEMBAHASAN

Hasil persentase rata-rata motilitas dapat diketahui bahwa perlakuan TKTS + 4,5% FBK memiliki nilai paling besar yaitu $35,75 \pm 3,27\%$ yang kemudian turun pada perlakuan TKTS + 6,0% FBK sebesar 6,00% menjadi $36,25 \pm 1,64\%$ (Tabel 1). Apabila dibandingkan dengan persentase rata-rata motilitas spermatozoa kambing kacang dalam pengencer TKTS dengan penambahan 4% ekstrak biji kelor yang disimpan selama 4 hari dalam suhu 5°C dari penelitian Hariadi (2018) sebesar $52 \pm 2,74\%$ dan penelitian Nanik (2018) yang menambahkan 2% FBK pada pengencer TKTS untuk spermatozoa kambing kacang selama 4 hari penyimpanan dalam suhu 5°C sebesar $51 \pm 4,18\%$ maka hasil penelitian ini memiliki nilai yang lebih rendah. Hal ini dapat terjadi karena adanya perbedaan dosis ekstrak dan filtrat yang diberikan, selain itu terdapat kemungkinan kandungan bioaktif dalam ekstrak lebih tinggi daripada filtrat. Pengaruh suhu -196°C yang digunakan pada penelitian ini tentunya mengakibatkan kerusakan membran sel spermatozoa juga semakin tinggi sehingga turut menurunkan motilitas. Semakin tinggi penambahan FBK maka akan terjadi penurunan motilitas. Hal ini diduga karena adanya penurunan pH sehingga menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel spermatozoa dan cairan intraseluler keluar sehingga nutrisi yang digunakan untuk bergerak menjadi berkurang. Senada dengan hasil penelitian Yahaq dkk. (2019) yang menyatakan bahwa semakin tinggi dosis antioksidan yang ditambahkan dalam pengencer, maka pH akan semakin rendah sehingga berakibat buruk bagi spermatozoa.

Persentase rata-rata viabilitas sesudah pembekuan pada Tabel 2 menunjukkan bahwa peningkatan dosis FBK yang diberikan sampai batas optimum perlakuan TKTS + 4,5% FBK menghasilkan persentase sebesar $56,75 \pm 1,09\%$, kemudian turun $5,25\%$ pada perlakuan TKTS + 6,0% FBK menjadi $51,50 \pm 2,29\%$. Hal ini menunjukkan bahwa pengencer yang digunakan dalam penelitian diduga mengandung nutrisi cukup untuk aktivitas metabolisme dan kehidupan sel spermatozoa juga sebagai krioprotektan yang berguna untuk melindungi membran sel yang mengandung lipid bilayer yang sangat rentan terhadap suhu ekstrim -196°C . Demikian pula lipoprotein dalam kuning telur yang berperan untuk melindungi membran sel spermatozoa dan menjaga tekanan osmosis dan gliserol yang berguna melindungi membran sel spermatozoa. Mekanisme perlindungan antioksidan pada FBK untuk mempertahankan kehidupan (viabilitas) spermatozoa adalah dengan mereduksi peroksidasi lipid yang mengakibatkan kerusakan membran plasma karena radikal bebas sehingga dapat mempertahankan kondisi homeostasis pada sitoplasma sel dan terpenuhinya sumber energi dari nutrient pada pengencer TKTS yang dipergunakan untuk aktivitas metabolisme dan kehidupan spermatozoa. Hal ini sesuai pernyataan Nanik (2018) dan Hariadi (2018) yang menyatakan bahwa ada keseimbangan antara FBK sebagai sumber antioksidan dan tris kuning telur sebagai penyanggah yang baik sehingga dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*). Apabila dibandingkan dengan persentase rata-rata viabilitas spermatozoa kambing kacang dalam pengencer TKTS dengan penambahan 4% ekstrak biji kelor yang disimpan selama 4 hari dalam suhu 5°C dari penelitian Hariadi (2018) sebesar $81,20 \pm 3,31\%$ dan penelitian Nanik (2018) yang menambahkan 2% FBK pada pengencer TKTS untuk spermatozoa kambing kacang selama 4 hari penyimpanan dalam suhu 5°C sebesar $76 \pm 3,65\%$. Kedua penelitian tersebut tidak melalui fase pembekuan sehingga menunjukkan hasil yang berbeda dengan penelitian ini. Diduga perbedaan lebih rendah 1% dibandingkan penelitian ini dikarenakan kandungan bioaktif dalam FBK lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak. Namun demikian hasil penelitian ini tetap bisa diimplementasikan sebagai pengencer.

Uji viabilitas pada **Gambar 1** menggunakan teknik pewarnaan eosin-negrosin yang memberikan warna merah pada spermatozoa mati karena membran tidak berfungsi dengan baik sehingga zat warna masuk ke dalam sel. Namun yang tidak memberikan warna mengindikasikan

spermatozoa tersebut masih hidup karena membran masih berfungsi dengan baik sehingga zat warna tidak masuk ke dalam sel. Dapat dilihat pada Tabel 1 tentang motilitas dan Tabel 2 tentang viabilitas bahwa motilitas dengan gerakan cepat ke depan pasti hidup dan dihitung; sedangkan gerakan bukan maju ke depan menunjukkan sel dalam kondisi hidup namun tidak dihitung. Berbeda dengan viabilitas, gerakan spermatozoa dihitung sebagai sel spermatozoa hidup. Dengan demikian jumlah motilitas dan viabilitasnya mempunyai nilai yang berbeda, yang lebih tinggi adalah viabilitas. Viabilitas dapat dijadikan untuk indikator kualitas spermatozoa. Didukung oleh Indriani dkk. (2013) dan Pratama dkk. (2018) bahwa warna merah pada spermatozoa menunjukkan spermatozoanya mati dan tidak berwarna menunjukkan spermatozoa hidup. Woli dkk. (2017) mengemukakan bahwa viabilitas merupakan tolok ukur paling penting untuk memperkirakan jangka waktu kehidupan spermatozoa ketika berada di dalam saluran reproduksi hewan betina. Namun demikian Ma dkk. (2019) menjelaskan bahwa nilai viabilitas yang lebih tinggi daripada nilai motilitas tidak memberikan pengaruh nyata karena jumlah spermatozoa hidup tidak mencerminkan spermatozoa motil progresif.

Penghitungan persentase integritas membran sel spermatozoa dilakukan dengan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS Test) untuk mengetahui keutuhan membran plasma (MPU). Spermatozoa yang memiliki membran normal akan menunjukkan ekor spermatozoa melingkar, sedangkan membran spermatozoa yang rusak menunjukkan ekornya lurus. Terbukti dari hasil penelitian ini yang sesuai dengan pernyataan Hidayat dkk., (2018) bahwa HOS Test yang mengindikasikan membran normal akan memperlihatkan ekor spermatozoa melingkar sedangkan ekor lurus menunjukkan membran spermatozoa rusak. Seperti halnya dengan motilitas dan viabilitas spermatozoa, demikian juga untuk integritas membran sel spermatozoa yang dipengaruhi kandungan dalam pengencer memiliki pengaruh selama proses pembekuan terhadap perlindungan dari kerusakan spermatozoa.

Filtrat Biji Kelor (FBK) dalam penelitian ini diduga kaya akan nutritent seperti asam amino esensial dan antioksidan. Di dalam pengencer TKTS juga terdapat kuning telur, larutan tris sitrat, dan gliserol. Kuning telur mengandung lipoprotein dan lecitin yang dapat melindungi lapisan fosfolipid bilayer membran plasma spermatozoa, gliserol dapat menjaga tekanan osmosis saat proses pembekuan dan selama penyimpanan dalam kondisi beku, larutan tris sitrat dalam pengencer berperan sebagai buffer, pengikat logam berat, dan dapat mendispersi lemak dari kuning telur. Dengan kompleksnya kandungan dalam pengencer TKTS yang ditambah FBK, diduga mampu menangkal radikal bebas sehingga meminimalisir pembentukan hidrogen peroksida dan anion superoksida yang mencegah terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan mereduksi peroksidasi lipid sehingga kerusakan membran plasma karena akibat radikal bebas menjadi rendah. Hal ini sesuai dengan pendapat Hardijanto dkk. (2010) yang menyatakan bahwa pengencer TKTS mengandung glukosa sebagai sumber energi, protein, dan vitamin yang larut minyak maupun air sehingga viskositas pengencer tidak toksik bagi spermatozoa. Andrianto (2016) menambahkan bahwa larutan tris sitrat berfungsi sebagai buffer, pengikat logam berat, mendispersi lemak dari kuning telur sehingga membentuk butiran lemak yang lebih halus dan isotonis terhadap membran plasma spermatozoa untuk aktivitas metabolisme spermatozoa.

Persentase integritas membran sesudah pembekuan pada Tabel 3 memperlihatkan peningkatan yang berkorelasi positif dengan peningkatan penambahan dosis FBK sampai batas optimum perlakuan TKTS + 4,5% FBK sebesar $54,50 \pm 1,50\%$ yang kemudian turun sebanyak 4,75% pada TKTS + 6,0% FBK menjadi sebesar $49,75 \pm 2,17\%$. Apabila dibandingkan dengan persentase rata-rata integritas membran spermatozoa dalam pengencer TKTS dengan penambahan 4% ekstrak biji kelor untuk spermatozoa kambing kacang yang disimpan selama 4 hari dalam suhu 5°C dari penelitian Hariadi (2018) sebesar $77 \pm 3,54\%$. Penelitian tersebut menghasilkan semen cair sehingga membran plasma spermatozoa relatif lebih utuh karena cekaman suhu rendah (*cold shock*) namun tidak separah bila disimpan pada suhu -196°C. Kerusakan lapisan fosfolipid bilayer pada membran plasma spermatozoa mengakibatkan naiknya tekanan osmotik dalam pengencer yang berarti nilai motilitas dan nilai keutuhan tudung akrosom (TAU) menurun karena terdapat gliserol yang memiliki tekanan osmotik cukup tinggi untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan membran plasma spermatozoa akibat disimpan pada suhu -196°C. Hal ini sesuai dengan penelitian Setiadi dkk. (2006) yang menyatakan tekanan osmotik gliserol sebesar $\pm 820-1100$ mosmol/kg. Tekanan osmotik tersebut dapat mengganggu transport aktif sumber energi seperti asam amino, asam lemak, dan glukosa. Didukung oleh Aku dkk. (2007) bahwa aliran nutrient dapat terganggu akibat terlalu tingginya tekanan osmotik cairan ekstraseluler. Selain itu, penurunan integritas membran yang ditandai dengan ekor spermatozoa lurus juga menunjukkan telah terjadinya *cold shock* sehingga terdapat aliran ion

yang melewati membran dan mereduksi lapisan lipid pada struktural membran plasma sehingga berdampak negatif terhadap fertilitas spermatozoa. Hal ini sesuai pendapat Isnawati dkk. (2016) dan Fannesia dkk. (2015) yang menyatakan bahwa kerusakan lapisan *fosfolipid bilayer* membran plasma spermatozoa ditandai dengan ekor yang lurus.

Pengujian integritas membran merupakan tolak ukur untuk mengetahui keutuhan membran plasma sel spermatozoa (MPU) yang terkait dengan metabolisme dan sistem transport sel (Herdis dkk., 2008). Hasil pengujian integritas membran yang tidak berbeda nyata pada sampel TKTS + 0%FBK; TKTS + 1,5% FBK; TKTS + 3,0% FBK; dan TKTS + 6,0% FBK menunjukkan bahwa osmolaritas pada perlakuan tersebut lebih tinggi daripada TKTS + 4,5% FBK yang memiliki osmolaritas lebih rendah.

Dari penelitian ini telah diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa persentase rata-rata motilitas spermatozoa sapi Brahman yang dihasilkan setelah penambahan FBK 1,5% sampai dengan 6,0% sesudah pembekuan sebesar $22,00 \pm 1,58\%$; $23,25 \pm 1,79\%$; $35,75 \pm 3,27\%$; dan $3,25 \pm 1,09\%$ sehingga persentase rata-rata motilitas seluruh perlakuan belum memenuhi SNI 4869:1 karena di bawah 40%. Dapat disimpulkan bahwa dosis FBK optimal 4,5% dengan motilitas setelah pembekuan sebesar $35,75 \pm 3,27\%$. Kualitas semen beku berdasarkan hasil uji Anava menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$). Dosis yang optimal dihasilkan sesudah penambahan Filtrat Biji Kelor (FBK) yaitu 4,5% dibandingkan dengan penambahan dosis FBK lainnya baik sebelum dan sesudah pembekuan.

Di dalam FBK pada pengencer semen sapi Brahman ini diduga terdapat berbagai asam amino esensial dan semi-esensial seperti leusin, fenilalanin, dan arginin juga kaya akan antioksidan diduga mampu menangkal radikal bebas sehingga tidak terjadi pembentukan hidrogen peroksida dan anion superoksida sehingga tidak memicu terjadinya *Reactive Oxygen Species* (ROS), impaknya dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan tersebut. Di samping itu, di dalam pengencer juga mengandung kuning telur antara lain kaya lemak (fosfolipid), energi dan larutan tris sitrat serta gliserol berfungsi melindungi membran sel spermatozoa agar tetap utuh, dimana membran selnya terdapat lipid bilayer. Dengan demikian, saat terjadi pembekuan, membran plasma spermatozoa dapat dilindunginya agar kerusakannya dapat ditekan. Senyawa antioksidan mampu menangkap hidrogen peroksida (H_2O_2) dan anion superoksida (O_2) yang memicu pembentukan *nitric oxide* (NO) sehingga mampu melindungi spermatozoa dari peroksidasi lipid akibat radikal bebas sehingga transpor sel tidak terganggu akibat masuknya ion kalsium yang dapat. Hal ini didukung oleh (Afrilia, 2016; Budiman, 2008) yang menyatakan *nitric oxide* dapat direduksi oleh antioksidan sekaligus vasodilator sel.

Penurunan kualitas spermatozoa sesudah pembekuan utamanya disebabkan oleh rusaknya permeabilitas lapisan fosfolipid hidrofilik membran plasma sel spermatozoa akibat perubahan volume dan perubahan tekanan osmotik. Dengan demikian, maka cairan intra seluler akan ke luar, padahal yang keluar dimungkinkan adalah nutrisi yang ke luar dari pengencer yang seharusnya digunakan untuk aktivitas motilitas, maka aktivitas tersebut menjadi berkurang karena nutrisi yang tersedia untuk motilitas juga berkurang. Hal ini sesuai pernyataan Devireddy dkk. (2002) dan Zelpina dkk. (2012) yang menyatakan bahwa penurunan kualitas spermatozoa sesudah pembekuan disebabkan oleh perubahan susunan rantai protein dan asam lemak pada membran plasma sel sehingga terjadi kerusakan yang menyebabkan ion-ion seperti ion kalsium masuk ke dalam sel, apabila hal ini terjadi maka akan memicu peningkatan pergerakan spermatozoa sehingga turut meningkatkan penggunaan energi daripada kondisi normal padahal sumber energi pada media pengencer terus menurun dan menyebabkan spermatozoa menghasilkan asam laktat yang terus meningkat kemudian memengaruhi daya hidup spermatozoa yang rentan terhadap pH bersifat asam. Hal ini sesuai dengan pendapat Suharman (2017) dan Sholihati dkk. (2008) yang menyatakan bahwa kerusakan membran akibat peroksidasi lipid membuat pengencer semakin asam dan bersifat toksik bagi spermatozoa. Semakin lama masa penyimpanan semen dalam kondisi beku maka semakin menurun pula motilitas, fungsi mitokondria yang menghasilkan ATP sebagai energi penggerak, dan integritas membran plasma sel spermatozoa (Fraser dkk., 2014). Selain itu, terdapat pula faktor lingkungan yang memengaruhi kualitas spermatozoa saat diperiksa seperti suhu panas dan dingin ruangan yang dapat mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi spermatozoa (Sarastina dkk., 2013).

Berdasarkan hasil penambahan FBK dalam pengencer TKTS mampu mempertahankan motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa sapi Brahman sebelum dan sesudah

pembekuan. Untuk penelitian selanjutnya direkomendasikan sebaiknya menggunakan ekstrak biji kelor karena kandungan bahan bioaktif yang lebih tinggi.

SIMPULAN

Simpulan berdasarkan hasil penelitian ini adalah penambahan filtrat biji kelor dalam pengencer tris kuning telur sitrat berpengaruh terhadap kualitas yang meliputi motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa Sapi Brahman sebelum dan sesudah pembekuan. Perlakuan TKTS + 4,5% merupakan dosis optimal yang menghasilkan persentase rata-rata motilitas sesudah pembekuan sebesar $35,75 \pm 3,27\%$; persentase rata-rata viabilitas sesudah pembekuan sebesar $56,75 \pm 1,09\%$; dan persentase rata-rata integritas membran sesudah pembekuan sebesar $54,50 \pm 1,50\%$.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrilia KN, 2016. Pengaruh Penambahan L-Arginin dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Merino *Post Thawing*. *Scientific Repository*: Universitas Airlangga.
- Aku S, Achmad B, Purwantara, dan Toelihere RM, 2007. Preservasi Semen Domba Garut (*Ovis aries*) dalam Berbagai Konsentrasi Bahan Pengencer Berbasis Lesitin Nabati. *Agribisnis Plus*; 17(1): 45-47.
- Andrianto F, 2016. Pengaruh Sari Kulit dan Buah Semangka Merah (*Citrillus lanatus*) sebagai Bahan Pengencer Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba. *Scientific Repository*: Universitas Airlangga.
- Ariyatun, Ningrum P, Musyarofah, dan Inayah N, 2018. Analisis Aktivitas Biji dan Daun Kelor (*Moringa oleifera*) untuk Penjernihan Air. *Walisono Journal of Chemistry*; 1(2): 60-65.
- Azizah R, 2020. Analisis *In Silico* dan Aktivitas Antioksidan Senyawa Nano Kompleks pada Daun dan Biji Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). *Scientific Repository*: Universitas Islam Malang.
- Badan Standarisasi Nasional, 2017. SNI 4869 Semen Beku Bagian 1 – Sapi. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Balai Inseminasi Buatan Ungaran, 2011. Intruksi Kerja Balai Inseminasi Buatan Ungaran. Jawa Tengah: BIB Ungaran.
- Bahriyah I, Haryati A, dan Zayadi H, 2015. Studi Etnobotani Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*) di Desa Sumber Kecamatan Tambelangan Kabupaten Sampang Madura. *BIO SAIN TROPIS*; 1(1): 61-67.
- Bergeron A, Brindle Y, Blondin P, dan Manjunath P, 2007. Milk Casein Decrease the Binding of the Major Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevent Lipid Loss from the Sperm Membrane During Sperm Storage. *Biology of Reproduction*; 77(1): 120-126.
- Budiman B, 2008. Peranan Protektif dan Non-Protektif Nitric Oxide (NO) pada Respon Imun. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Devireddy RV, Swanlund DJ, Olin T, Vincente W, Troedson MHT, Bischof JC, dan Roberts KP, 2002. Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates In The Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry. *Biology of Reproduction*; 66(1): 222-231.
- Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian RI, 2019. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta: Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian RI.
- Ducha N, 2018. The Test About Blood Serum Capabilities in Maintaining the Quality of Bull Spermatozoa During Storage in CEP Diluent at Refrigerator Temperature. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 130.
- Fannesia LD, Karja NWK, Adnyane IKM, dan Setiadi MA, 2015. Pelacakan Kerusakan Akrosom Spermatozoa Domba Selama Pembekuan dengan Teknik Histokimia Lektin. *Jurnal Veteriner*; 16(4): 560-568.
- Feradis, 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Bandung: Alfabeta.
- Futino DO, Mendes MCB, Matos WNL, Mondadori RG, dan Lucci CM, 2010. Glycerol, Methyl-Formamide, and Dimethyl-Formamide in Canine Semen Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animal*; 45(2): 214-220.
- Fraser L, Strzezek J, dan Kordan W, 2014. Post-thaw Sperm Characteristic Following Long-term Storage of Boar Semen in Liquid Nitrogen. *Animal Reproduction*; 147(3-4): 119-127.
- Gogol P dan Wierzechos-Hilczer, 2009. Membrane Integrity, Energy Status, and Motility of Rabbit Spermatozoa Stored for 2 Days at 15°C. *Journal of Animal Science*; 9(1): 27-32.
- Hardijanto S, Susilowati T, Hernawati T, Sardjito TW, dan Suprayogi, 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Surabaya: Airlangga University Press.
- Hariadi I, 2018. Pengaruh Level Ekstrak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) pada Pengencer Tris Kuning Telur Ayam dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Kambing Kacang pada Suhu 5°C. Publikasi Ilmiah: Universitas Mataram.
- Herdis M, Surachman, Yulnawati, dan Rizal M, 2008. Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang pada Penambahan Maltosa dalam Pengencer Andromed®. *Journal of Indonesian Tropical Animal Agriculture*; 33(2): 101-106.
- Hidayat N, Dasrul, Hamdan, Husnurrizal, Akmal M, dan Lubis TM, 2018. Integritas Membran Plasma Spermatozoa Sapi Aceh Pasca Pembekuan dalam Media Sitrat Kuning Telur dengan Waktu Ekuilibrisasi yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*; 2(1): 110-116.

- Husin N, Tatik S, dan Kususiayah, 2007. Uji Kualitas Semen Kambing Nubian dan Peranakannya (Kambing Nubian X PE) serta Kambing Boer Berdasarkan Lama Penyimpanan. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*; 2(2): 58-65.
- Indriani, Susilawati T, dan Wahyuningsih S, 2013. Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Metode *Water Jacket* dan *Free Water Jacket*. *Jurnal Veteriner*; 14(3): 379-386.
- Isnawati, Tjandrakirana, dan Duchu N, 2016. Evaluasi Bilangan MDA (Malondiadehid) Sebagai Indikator Terjadinya Perusakan Integritas Membran Spermatozoa yang Disimpan pada Berbagai Larutan Pengencer. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*: 112-115.
- Laha KM, 2018. Aktivitas Antioksidan Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera* L.) yang Diperoleh Dari okletasi dan Maserasi dengan Metode DPPH (1,1diphenyl-2-phycrylhydrazyl). Karya tulis ilmiah: Politeknik Kesehatan KEMENKES Kupang.
- Lalus FN, Pareira LAM, dan Lalang AC, 2021. Analisis Kandungan Flavonoid Total pada Ekstrak Etanol Buah Kelor (*Moringa oleifera Lamk*) dengan Menggunakan Metode Spektrofotometer UV-VIS. *Media Sains*; 21(1): 66-70.
- Ma MBL, Foeh MDFK, dan Gaina CD, 2019. Pengaruh Pengencer Komersial terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Semen Babi *Landrace* yang Disimpan pada Temperatur Berbeda. *Jurnal Veteriner Nusantara*; 2(2): 60-71.
- Mann K and Mann M, 2008. *The Chicken Egg Yolk Palsma and Granule Proteomes*. *Proteomics*; 8(1): 178-191.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK, 2005. *Adding Cholesterol to The Stallion Sperm Plasma Membrane Improves Cryosurvival*. *Cryobiol*; 51(1): 241-249.
- Nanik NK, 2018. Pengaruh Filtrat Biji Kelor (*Moringa oleifera*) pada Pengencer Tris Kuning Telur Ayam dalam Mempertahankan Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Kambing Kacang pada Suhu 5°C. Publikasi ilmiah: Universitas Mataram.
- Nebel RL, 2007. *Techniques for Artificial Insemination of Cattle with Frozen Thawed Semen*. Missouri: Saunders Elsevier.
- Novita R, Karyono T, dan Rasminah, 2019. Kualitas Semen Sapi Brahman pada Persentase Tris Kuning Telur yang Berbeda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*; 14(4): 351-358.
- Ogbuewu IP, Aladi NO, Etuk IF, Opara MN, Uchegbu MC, Okoli IC, dan Iloeje, 2010. *Relevance of Oxygen Free Radicals and Antioxidant in Sperm Production and Function*. *Research Journal of Veterinary Science*; 3(3): 138-164.
- Pamungkas FA dan Krisnan R, 2017. Pemanfaatan Sari Kedelai sebagai Bahan Pengencer Pengganti Kuning Telur untuk Kriopreservasi Spermatozoa Hewan. *Jurnal Litbang Pertanian*; 16(1): 21-27.
- Pratama JWA, Sari DAK, dan Sigit M, 2018. Pengaruh Beberapa Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Simmental. *Jurnal Ilmiah Filla Cendekia*; 3(2): 39-45.
- Priyanto L, Arifiantini RI, dan Yusuf TL, 2015. Deteksi Kerusakan DNA Spermatozoa Semen Segar dan Semen Beku Sapi Menggunakan Pewarna Toluidine Blue. *Jurnal Veteriner*; 16(1): 48-55.
- Purwoistri RF, Susilawati T, dan Rahayu S, 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan *Cauda Epididymal Plasma-2* Ditambahkan Kuning Telur. *Jurnal Veteriner*; 14(3): 371-378.
- Riyadhi M, Haris A, Sumantri I, dan Rizal M, 2017. Kemampuan Sari Melon dalam Mempertahankan Kualitas Semen Kambing Peranakan Ettawa. Artikel disajikan dalam *Prosiding Semnas Peternakan 2017*
- Rosmaidar, Dasrul, dan Lubis TM, 2013. Pengaruh Penambahan Sari Buah Tomat dalam Media Pengencer Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 3-5°C. *Jurnal Ilmiah Peternakan*; 1(1): 7-17.
- Rumende RRH, Kalim H, Widodo MA, dan Djati MS, 2007. Peningkatan Kualitas Spermatozoa pada Proses Pemisahan Spermatozoa dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Melalui Pemberian Fosfolipid. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*; 23(2): 71-81.
- Sakinah N, Prangdimurti E, dan Palupi NS, 2019. Kandungan Gizi dan Mutu Protein Tepung Biji Kelor Terfermentasi. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*; 30(2): 152-160.
- Sari AN, 2016. Berbagai Tanaman Rempah sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Elkawnie*; 2(2): 203-212.
- Sarastina, Susilawati T, dan Ciptadi G, 2013. Analisis Beberapa Parameter Motilitas Spematozoa pada Berbagai Bangsa Sapi. *Jurnal Ternak Tropika*; 6(2): 1-12.
- Savitri FK, Suharyati S, dan Siswanto, 2014. Kualitas Semen Beku Sapi Bali dengan Penambahan Berbagai Dosis Vitamin C pada Bahan Pengencer Skim Kuning Telur. *Jurnal Ilmu Peternakan Terpadu*; 2(3): 30-36.
- Setiadi MA, Surayogi A, Yulnawati, 2006. Viabilitas dan Integritas Membran Plasma Spermatozoa Epididymis Anjing Selama Penyimpanan pada Pengencer yang Berbeda. *Media Kedokteran Hewan*; 22(2): 118-123.
- Setiono N, Suharyati S, dan Santosa PE, 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman dengan Dosis Krioprotektan Gliserol yang Berbeda dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal Ilmu Peternakan Terpadu*; 3(2): 61-69.
- Sholihati N, Idi R, Rasad SD, Rixal M, dan Fitriati M, 2008. Kualitas Spermatozoa Cauda Epididimis Sapi Peranakan Ongole (PO) dalam Penegncer Susu, Tris, dan Sitrat Kuning Telur pada Penyimpanan 4-5°C. *Animal Production*; 10(1): 22-29.

- Siswandoko B, Zaenab S, dan Husamah, 2017. Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga Kedalam Pengencer Tris Kuning Telur untuk Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Ettawa. *Scripta Biologica*; 4(4): 247-251.
- Sudaryanto, Herwanto T, dan Putri SH, 2016. Aktivitas Antioksidan pada Minyak Biji Kelor (*Moringa oleifera*) dengan Metode Sokletasi Menggunakan Pelarut N-Heksana, Metanol dan Etanol. *Jurnal Teknotan*; 2(2): 16-21.
- Suharman H, 2017. Kualitas Semen Beku Domba Garut (*Ovis aires*) pada Penambahan Sukrosa dalam Pengencer Tris Kuning Telur. *Berita Biologi*; 16(1): 31-38.
- Susilawati T, 2011. Spermatologi. Malang: Universitas Brawijaya (UB) Press.
- Toelihere MR, 2006. Pokok-Pokok Pikiran tentang Perkembangan (Bio) Teknologi Reproduksi di Masa Lalu, Masa Kini, dan Masa yang Akan Datang dalam Menunjang Pembangunan Peternakan di Indonesia. Bogor: FKH IPB.
- Widjaja N, Akhdiat T, dan Purwasih D, 2017. Pengaruh Deposisi Semen terhadap Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) Sapi Peranakan Ongole. *Sains Peternakan*; 15(2): 49-51.
- Winarsi, 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius.
- Woli SL, Kusumawati ED, dan Krisnaningsih ATN, 2017. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ayam Kampung pada Suhu 5°C Menggunakan Pengencer dan Lama Simpan yang Berbeda. *Jurnal Sains Peternakan*; 5(2): 138-144.
- Wulandari R, Budiyanto MAK, dan Waluyo L, 2016. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Ekstrak Bunga Mawar Merah (*Rosa damascena* Mill) Terhadap Stabilitas Warna Antosianin Agar-Agar Sebagai Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*; 2(1): 48-56.
- Yahaq MA, Ondho YS, dan Sutiyono, 2019. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Semen Sapi Limousin yang Dibekukan Terhadap Kualitas *Post Thawing*. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*; 14(4): 380-386.
- Zelpina E, Rosadi B, dan Sumarsono T, 2012. Kualitas Spermatozoa *Post Thawing* dari Semen Beku Sapi Perah. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*; 2(1): 94-102.

Article History:

Received: 28 Juli 2022

Revised: 1 Januari 2023

Available online: 31 Januari 2023

Published: 31 Januari 2023

Authors:

Arif Rahmansyah, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: arif.18002@unesa.ac.id

Dyah Hariani, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Surabaya, Jalan Ketintang Gedung C3 Lt.2 Surabaya 60231, Indonesia, e-mail: dyahhariani@unesa.ac.id

How to cite this article:

Rahmansyah A, Hariani D, 2023. Pengaruh Penambahan Filtrat Biji Kelor Dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Brahman. *LenteraBio*; 12(1): 29-40.