



PENGARUH PENAMBAHAN EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR DALAM PENGECER SUSU KACANG KEDELAI SANGRAI TERHADAP KUALITAS SEMEN BABI LANDRACE

Ludgardis Prima Monda Moa

adryanomosa@gmail.com

Universitas Nusa Cendana Kupang

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan ekstrak etanol daun kelor (EEDK) dalam pengencer susu kacang kedelai sangrai (SKKS) terhadap kualitas semen babi landrace. Semen dikoleksi dua kali seminggu menggunakan metode massage dari pejantan landrace berumur 2,5 tahun yang memiliki kondisi tubuh dan organ reproduksi yang sehat. Semen yang menunjukkan kualitas baik dibagi empat, masing-masing diencerkan dengan SKKS KT 100% (P0), SKKS KT + EEDK 1% (P1), SKKS KT + EEDK 3% (P2), SKKS KT + EEDK 5% (P3). Semen yang telah diencerkan disimpan pada styrofoam pada suhu 18-20°C dan dievaluasi motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa setiap 8 jam selama 48 jam. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap yang terdiri atas 4 perlakuan dan 4 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa yang disimpan selama 48 jam dalam pengencer SKKS KT + EEDK 3% (P2) memiliki motilitas 31,75% dan viabilitas 41,19% dan daya tahan hidup 41,68 jam lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada ketiga pengencer lainnya, sedangkan abnormalitas dalam keempat pengencer berbeda tidak nyata ($P > 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah penambahan ekstrak etanol daun kelor sebanyak 3% dalam pengencer susu kacang kedelai sangrai lebih efektif dalam mempertahankan kualitas semen babi landrace.

Kata kunci: Babi Landrace, Ekstrak Etanol Daun Kelor, Spermatozoa, Susu Kacang Kedelai Sangrai.

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of adding moringa leaf ethanol extract (MLEE) in roasted soybean milk (RSbM) diluent on the semen quality of landrace boar. Semen was collected twice a week using the massage method from a 2.5 years old landrace boar was had a healthy body condition and reproductive organs. Semen that showed good quality was divided into four, each diluted with RSbM EY 100% (D0), RSbM EY + MLEE 1% (D1), RSbM EY + MLEE 3% (D2), RSbM EY + MLEE 5% (D3). The diluted semen was stored in styrofoam at 18-20°C and evaluated for spermatozoa motility, viability, abnormality and survival every 8 hours. The design used was a completely randomized design consisting of 4 treatments and 4 replications. The results showed that spermatozoa stored for 48 hours in RSbM EY + MLEE 3% (D2) had motility 31,75% and viability 41,19% and survival 41,68 hours higher ($P < 0.05$) than three other diluents, while the abnormalities in the four diluents were not significant ($P > 0.05$) The conclusion of the study was adding 3% moringa leaf ethanol extract to roasted soybean milk diluent is effective in maintaining the quality of liquid semen of landrace boars.

Keywords: Ethanol Extract Moringa Leaves, Landrace Boar, Roasted Soybean Milk, Spermatozoa.

PENDAHULUAN

Keberhasilan penerapan program IB dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah kualitas semen yang digunakan (Tamoës et al., 2014). Ternak babi memiliki semen yang berbeda dengan semen ruminansia lainnya seperti sapi dan kambing, karena spermatozoa semen babi mempunyai komposisi membran plasma yang tinggi yaitu 24% phosphatidylethanolamine dan 14% sphingomyelin, dapat bertahan pada suhu 15-20°C sehingga mudah mengalami cold shock saat preservasi (Paulenz et al., 2000). Kualitas semen ditentukan oleh berbagai faktor salah satunya adalah proses pengolahan semen yang meliputi pengenceran dan penyimpanan semen, dengan adanya pengenceran semen ini maka memungkinkan untuk dapat menginsinerasi lebih banyak lagi ternak betina. Syarat bahan pengencer adalah harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, harus memungkinkan spermatozoa dapat bergerak progresif, tidak bersifat toksik dan dapat menjadi penyangga bagi spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk kejutan dingin (cold shock) (Solihati dan Kune, 2009). Secara umum, bahan pengencer terdiri atas tiga bagian yaitu bahan dasar seperti kuning telur dan susu, bahan penyangga (buffer) seperti asam sitrat dan tris, serta bahan tambahan seperti gliserol dan antibiotik (Hafez, 2000).

Salah satu bahan pengencer alami dan mudah diperoleh yang dapat digunakan untuk pengenceran semen babi adalah susu kacang kedelai sangrai (SKKS). Susu kacang kedelai mengandung karbohidrat, protein, kalsium lipoprotein dan lesitin sehingga dapat digunakan sebagai salah satu bahan pengencer dan berfungsi dalam mempertahankan dan melindungi integritas membran plasma spermatozoa (Aboagla dan Terada, 2004; Bergeron dan Manjunath, 2006). Kacang kedelai memiliki kandungan lesitin sebesar 1,488-3,08%. Keunggulan lesitin kacang kedelai memiliki kandungan phospholipid antara lain fosfatidil choline 17,50% dan 23,00%, fosfatidil ethanolamine 15,00% dan 20,00%, glikolipid 13-16%, phospholipid lainnya 14-18% dan trigliserida 2-4%. Penggunaan susu kacang kedelai sebagai pengencer semen telah dilaporkan Tamoës et al. (2014) pada semen babi, Rezki et al. (2016) pada semen sapi peranakan ongole (PO) dan Immelda et al. (2019) pada semen domba sapudi.

Selain melindungi spermatozoa dari cekaman dingin pada saat preservasi, pengencer juga perlu bahan tambahan kuning telur sebagai sumber energi. Kuning telur merupakan komponen penting dalam pengencer, karena kandungan nutrisi yang terdapat dalam kuning telur mampu melindungi akrosom spermatozoa selama penyimpanan (Amirat et al., 2004). Kandungan yang terdapat di dalam kuning telur diantaranya adalah fosfolipid kolesterol dan lipoprotein yang berperan penting dalam melindungi spermatozoa terhadap kejutan dingin selama proses pendinginan (Kulaksiz et al., 2010). Selain itu, kuning telur juga mempunyai sifat sebagai penyangga tekanan osmotik sehingga spermatozoa lebih toleran terhadap lingkungan yang hipotonik atau hipertonik (Khalifa dan El-Saidy, 2006). Namun, kuning telur sebagai komponen bahan pengencer memiliki resiko kontaminasi mikroorganisme seperti bakteri dan jamur (Gil et al., 2003). Oleh karena itu dalam pengencer juga perlu ditambahkan antibiotik seperti penicillin dan streptomycin untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Situmorang et al. (2000) menyatakan bahwa keterbatasan viabilitas spermatozoa, selain disebabkan oleh defisit energi dan kerusakan membran plasma akibat protein plasma, kematian spermatozoa juga disebabkan oleh kerusakan membran plasma akibat dari peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan proses yang bersifat kompleks akibat reaksi asam lemak tak jenuh ganda penyusun fosfolipid membran sel dengan reactive oxygen species (ROS). Dalam upaya mengurangi kerusakan membran spermatozoa akibat peroksidasi lipid selama penyimpanan, maka dilakukan penambahan antioksidan pada

bahan pengencer. Salah satu bahan yang kaya akan antioksidan adalah daun kelor.

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) mengandung vitamin A, B, C, E dan K, alanin, alfa-karoten, arginin, beta-karoten, beta-sitosterol, asam kafeoilkuinat, kampesterol, karotenoid, klorofil, kromium, delta-5-avenasterol, delta-7-avenasterol, glutathion, histidine, asam asetat indol, indoleasetonitril, kaempferal, leucine, lutein, metionin, asam miristat, asam palmitat, prolamin, prolin, kuersetin, rutin, selenium, treonin, triptofan, xantin, xantofil, zeatin, zeasantin, zinc (Kurniasih, 2013). Vitamin C dan E yang berada di daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) mempunyai kemampuan sebagai antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas dan melindungi biomembran dari radikal bebas (Siregar, 2009).

METODE

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan metode penelitian rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 4 ulangan. Adapun perlakuan dalam penelitian ini adalah P0: SKKS KT 100%, P1: SKKS KT + EEDK 1%, P2: SKKS KT + EEDK 3% dan P3: SKKS KT + EEDK 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas adalah persentase gerakan spermatozoa yang maju ke depan secara progresif. Motilitas dinilai secara mikroskopis dengan prosedur visual, dinyatakan secara komperatif (tidak mutlak) dan bersifat subjektif. Motilitas spermatozoa atau daya gerak sperma merupakan salah satu penentu keberhasilan spermatozoa untuk dapat mencapai ovum di dalam tuba Fallopi dan merupakan cara yang paling sederhana dalam penilaian spermatozoa untuk inseminasi buatan (Garner dan Hafez, 2000). Sifat morfologi dan pola metabolisme khusus yang dimiliki oleh spermatozoa menyebabkan spermatozoa mampu bergerak maju ke depan pada lingkungan cair. Rerata motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase motilitas spermatozoa babi landrace

Jam Pengamatan	Level ekstrak etanol daun kelor (%)				P-value
	P0	P1	P2	P3	
Semen Segar	80 ± 4,08	80 ± 4,08	80 ± 4,08	80 ± 4,08	
0	80,00 ± 4,08 ^a	80,00 ± 4,08 ^a	80,00 ± 4,08 ^a	80,00 ± 4,08 ^a	1,00
8	66,25 ± 4,79 ^b	70,00 ± 4,08 ^{ab}	75,00 ± 4,08 ^a	70,00 ± 4,08 ^{ab}	0,08
16	57,50 ± 5,00 ^b	60,00 ± 4,08 ^b	68,75 ± 2,50 ^a	60,00 ± 5,77 ^b	0,02
24	48,75 ± 2,98 ^c	53,75 ± 2,50 ^b	62,00 ± 3,56 ^a	51,25 ± 2,50 ^{bc}	0,00
32	38,75 ± 6,50 ^b	45,50 ± 5,26 ^{ab}	52,50 ± 6,45 ^a	41,25 ± 4,79 ^b	0,02
40	29,25 ± 6,89 ^b	36,75 ± 7,89 ^{ab}	43,25 ± 7,89 ^a	33,25 ± 3,94 ^{ab}	0,07
48	18,75 ± 6,29 ^b	26,75 ± 5,62 ^{ab}	31,75 ± 5,68 ^a	25,25 ± 2,06 ^{ab}	0,03

Keterangan: Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Berdasarkan Tabel 1. pada pengamatan jam ke-0 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas spermatozoa yang signifikan ($P > 0,05$) karena persentase motilitas spermatozoa masih sama dengan yang diamati pada semen segar (sebelum pengenceran). Hal ini terjadi karena pengamatan dilakukan segera setelah pengenceran sehingga ketersediaan energi yang masih tercukupi dan daya gerak spermatozoa yang masih progresif.

Semakin lama penyimpanan, persentase motilitas spermatozoa pada keempat perlakuan juga mengalami penurunan. Hal ini disebabkan karena menurunnya zat makanan spermatozoa, pengaruh zat toksik dari peningkatan asam laktat hasil sampingan dari proses metabolisme spermatozoa, perubahan tekanan osmotik, kerusakan membran spermatozoa akibat peroksidasi lipid, stress pada spermatozoa akibat adanya kejutan dingin (cold shock). Tamoës et al. (2014) menyatakan bahwa pengaruh utama dari kejutan dingin terhadap sel spermatozoa adalah penurunan motilitas dan daya tahan hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Suasana asam yang disebabkan oleh penimbunan asam laktat yang menyebabkan kerusakan organel-organelnya sehingga metabolisme sebagai upaya untuk memperoleh energi terganggu. Berkurangnya metabolisme mengakibatkan energi yang dihasilkan juga ikut berkurang dan akan menurunkan motilitas spermatozoa. Peroksidasi lipid menyebabkan rusaknya membran hingga menurunkan motilitas spermatozoa, karena membran spermatozoa banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap radikal bebas (Maxwell dan Watson, 1996).

Hasil uji statistik menggunakan ANOVA, pada penyimpanan jam ke-0 semua perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa. Sedangkan pada jam ke-16 sampai jam ke-40 penyimpanan perlakuan memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa. Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan pada jam ke-40 penyimpanan, perlakuan P2 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan P0 tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan P1 dan P3 begitupun P0 tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan P1 dan P3.

Pada perlakuan P0 (kontrol) menunjukkan adanya kecepatan penurunan persentase motilitas yang tinggi (10,21%) disebabkan karena kandungan lesitin yang tinggi dari susu kacang kedelai sangrai dan kuning telur yang membatasi ruang gerak spermatozoa. Hal ini didukung oleh pernyataan Rahayu et al. (2014) bahwa konsentrasi lesitin yang tinggi dalam susu kacang kedelai dapat menutupi spermatozoa sehingga tidak jelas terlihat dan ruang geraknya terbatas. Selain itu kecepatan penurunan motilitas yang tinggi pada perlakuan P0 dapat disebabkan karena pada perlakuan ini tidak mengandung antioksidan sehingga mudah mengalami peroksidasi lipid. Kandungan asam lemak tak jenuh dalam susu kacang kedelai sangrai yang tinggi bereaksi dengan radikal bebas atau reactive oxygen species (ROS) sehingga menyebabkan kerusakan pada sel dan berakibat menurunkan motilitas spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pernyataan Gogol and Wiezchos-Hilczer (2009) bahwa tingginya komposisi spermatozoa dengan asam lemak tak jenuh memiliki konsekuensi membran spermatozoa menjadi rentan terhadap peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid yang meluas menimbulkan kerusakan oksidatif terhadap asam lemak tak jenuh ganda atau lipid yang memiliki lebih dari dua ikatan kovalen karbon-karbon. Kondisi ini menyebabkan instabilitas membran karena terputusnya rantai asam lemak menjadi senyawa yang bersifat toksik yang merusak membran sel (Ogbuewu et al., 2010). Efek peroksidasi pada spermatozoa beberapa mamalia adalah kerusakan struktur membran plasma secara permanen, menurunnya motilitas dan kemampuan fertilisasi, penghambatan fruktolisis dan respirasi dan pengikatan enzim intraseluler (Anghel et al., 2009).

Hal lain yang juga menjadi penyebab kecepatan penurunan motilitas pada perlakuan P0 adalah efek negatif dari kandungan kalsium yang tinggi dalam susu kacang kedelai sehingga mempengaruhi kapasitas spermatozoa (Tamoës et al., 2014). Menurut Aalbers et al. (1985) konsentrasi kalsium ekstraseluler yang tinggi di dalam medium dapat menurunkan motilitas dan metabolisme spermatozoa dengan cepat karena adanya pengikatan kadar ion-ion intraseluler di dalam sel, demikian sebaliknya jika kadar ion

intraseluler rendah dalam media pengencer mampu menstimulir metabolisme sel. Pernyataan ini didukung pula oleh Hammerstedt et al. (1993) yang menyatakan konsentrasi kalsium yang tinggi berkaitan dengan tingkat kapasitas dan hiperaktif pada spermatozoa yang normal sehingga penurunan motilitas mudah terjadi yang ditandai dengan spermatozoa tidak bergerak maju maupun bergerak di tempat.

Pada perlakuan P2 mengalami penurunan motilitas spermatozoa yang lebih sedikit (8%) dibandingkan perlakuan lainnya, sehingga pada jam ke-40 penyimpanan perlakuan P2 memiliki motilitas spermatozoa tertinggi yaitu 43,25% diikuti P1 (36,75%), P3 (33,25%) dan motilitas spermatozoa terendah pada P0 yaitu 29,25%. Hal ini memberikan petunjuk bahwa dengan penambahan EEDK sebanyak 3% ke dalam pengencer SKKS menghasilkan motilitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan level EEDK 0%, 1% dan 5%. Lebih tingginya persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan P2 diduga disebabkan oleh adanya zat nutrisi dalam pengencer SKKS dan antioksidan yang terkandung dalam EEDK. Pemberian EEDK yang tepat memberikan hasil yang maksimal untuk mencegah peroksida lipid, sehingga mampu mengurangi kerusakan yang terjadi pada membran plasma spermatozoa. Antioksidan di dalam daun kelor mempunyai aktivitas menetralkan radikal bebas sehingga mencegah kerusakan oksidatif pada sebagian besar biomolekul dan menghasilkan proteksi terhadap kerusakan oksidatif secara signifikan (Sreelatha dan Padma, 2009). Daun kelor kaya akan makronutrien dan mikronutrien seperti β -karoten, protein, vitamin C, E dan kalium, serta bertindak sebagai sumber antioksidan alami yang sangat bermanfaat untuk menunjang motilitas spermatozoa (Johnson et al., 2000).

Penambahan ekstrak daun kelor sebagai antioksidan yang mampu mempertahankan motilitas, morfologi dan integritas membran spermatozoa telah dilaporkan oleh Sukonbi et al. (2015) pada semen sapi selama lebih dari 72 jam pada suhu dingin 6°C dan pada babi Landrace dengan konsentrasi 5% dalam pengencer sitrat-kuning telur (Fafu et al., 2016) dan konsentrasi 1% dalam pengencer air buah lontar pada suhu 22°C (Gena et al., 2020). Persentase motilitas terbaik hasil penelitian ini terdapat pada perlakuan P2 yaitu 43,25% pada jam ke-40 penyimpanan. Penelitian ini mengindikasikan bahwa penambahan ekstrak etanol daun kelor ke dalam pengencer susu kacang kedelai sangrai berdampak positif terhadap motilitas spermatozoa babi landrace.

Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas merupakan indikator lain dari kualitas sperma dan berhubungan erat dengan motilitas spermatozoa. Umumnya persentase viabilitas spermatozoa selalu lebih tinggi daripada motilitas spermatozoa, karena variabel viabilitas spermatozoa menghitung semua spermatozoa yang hidup yang terdiri atas spermatozoa yang bergerak progresif, bergerak sirkuler, dan bergerak di tempat, sedangkan yang tergolong variabel motilitas hanya yang bergerak maju secara progresif. Persentase normal viabilitas spermatozoa adalah >58% dikatakan hidup bila spermatozoa tidak menyerap warna pada pewarnaan differensial eosin-negrosin, sebaliknya dikatakan mati bila spermatozoa menyerap warna (Wibisono, 2010). Hal ini disebabkan karena membran plasma secara fisik dan fungsional masih utuh. Eosin-negrosin yang berikatan dengan natrium sitrat akan masuk ke dalam sel, tetapi karena membran plasma masih berfungsi maka senyawa natrium dan eosin-negrosin ini dikeluarkan kembali dari dalam sel oleh mekanisme kerja pompa sodium. Penyebab lain karena secara fisiologik konsentrasi Na di dalam sel lebih rendah daripada di luar sel. Pada spermatozoa mati, membran plasma spermatozoa termasuk pompa sodium sudah rusak, sehingga senyawa Na dan eosin-negrosin yang masuk ke dalam sel tidak lagi dipompa ke luar dan tetap bertahan dalam sel yang mengakibatkan kepala spermatozoa berwarna merah-keunguan. Rerata viabilitas spermatozoa ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2 Persentase viabilitas spermatozoa babi landrace

Jam Pengamatan	Level ekstrak etanol daun kelor (%)				P-value
	P0	P1	P2	P3	
Semen Segar	94,23 ± 3,57	94,23 ± 3,57	94,23 ± 3,57	94,23 ± 3,57	
0	94,45±3,52 ^a	94,17±3,18 ^a	94,14±3,37 ^a	94,07±3,57 ^a	0,99
8	80,22±7,06 ^a	82,43±5,36 ^a	86,32±4,62 ^a	81,29±7,13 ^a	0,54
16	68,16±4,78 ^a	66,71±14,39 ^a	78,29±3,99 ^a	68,97±6,94 ^a	0,26
24	57,65±4,44 ^b	64,47±2,62 ^b	73,33±2,78 ^a	59,54±7,72 ^b	0,00
32	46,42±6,71 ^b	56,18±6,37 ^{ab}	62,88±7,50 ^a	47,83±8,43 ^b	0,03
40	37,81±9,15 ^b	45,08±10,47 ^{ab}	53,12±7,74 ^a	42,27±4,38 ^{ab}	0,12
48	29,43±7,88 ^b	37,16±5,45 ^{ab}	41,19±3,04 ^a	34,04±4,32 ^{ab}	0,06

Keterangan: Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Dari Tabel 2. dapat dilihat bahwa setiap perlakuan mengalami penurunan viabilitas spermatozoa yang berbeda-beda setelah pengenceran hingga 48 jam penyimpanan. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan dari setiap pengencer yang berbeda dalam menyumbangkan zat-zat makanan yang dibutuhkan untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa dan mampu memperlambat penurunan derajat keasaman yang ditimbulkan karena adanya aktivitas metabolisme spermatozoa.

Hasil analisis sidik ragam ANOVA menunjukkan pada penyimpanan jam ke-0 sampai jam ke-16 viabilitas spermatozoa menunjukkan pengaruh yang tidak nyata ($P > 0,05$), sedangkan pada penyimpanan jam ke-24 sampai jam ke-40 menunjukkan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) antarperlakuan. Hasil uji Duncan menunjukkan pada jam ke-40 perlakuan P2 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan P0 tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan P1 dan P3 begitupun perlakuan P0 (kontrol) berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) dengan P1 dan P3.

Secara umum, penambahan EEDK sebanyak 3% dalam pengencer SKKS (P2) menghasilkan persentase viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi ($P < 0,05$) terutama pada penyimpanan 40 jam dengan nilai viabilitas 53,12% dan terendah pada perlakuan P0 yaitu 37,81%. Viabilitas spermatozoa berkaitan dengan kemampuan fertilitas spermatozoa, ketika viabilitas spermatozoa tinggi maka kemampuan untuk membuahi sel telur atau daya fertilitas juga tinggi (Blegur et al., 2020). Viabilitas spermatozoa sangat dipengaruhi oleh nutrisi yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama penyimpanan. Viabilitas spermatozoa akan menurun ketika ketersediaan nutrisi sebagai sumber energi dalam pengencer berkurang (Hidayaturrahmah, 2018).

Penurunan viabilitas spermatozoa bersamaan dengan penurunan motilitas seiring dengan lamanya masa penyimpanan, namun tidak secepat penurunan motilitas. Penurunan viabilitas spermatozoa yang tinggi pada perlakuan P0 dapat dipengaruhi oleh tidak tersedianya antioksidan dalam pengencer sehingga spermatozoa mudah terserang radikal bebas yang dapat merusak membran spermatozoa dan menurunkan viabilitas. Berbeda dengan perlakuan P2 yang ditambahkan ekstrak etanol daun kelor sebagai antioksidan mampu menekan serangan radikal bebas dan mempertahankan viabilitas spermatozoa. Hal ini menggambarkan bahwa dengan konsentrasi yang demikian, kandungan antioksidan yang terdapat dalam ekstrak etanol daun kelor sudah cukup optimal untuk menghambat efek negatif dari radikal bebas yang dapat menyerang lipid pada membran plasma spermatozoa (Fafu et al., 2016). Prinsip kerja dari antioksidan dalam menghambat oksidasi

pada lemak yaitu oksigen bebas di udara akan mengoksidasi ikatan rangkap pada asam lemak yang tidak jenuh, kemudian radikal bebas yang terbentuk akan beraksi dengan oksigen sehingga akan menghasilkan peroksida aktif.

Herdis et al. (2005) menyatakan bahwa kematian spermatozoa yang tinggi pada proses pengolahan semen disebabkan oleh rusaknya membran plasma spermatozoa akibat peroksida lipid yang menyebabkan penurunan viabilitas spermatozoa. Hal ini terjadi karena membran spermatozoa banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap kerusakan peroksidasi (Maxwell dan Watson, 1996). Penambahan EEDK pada pengencer mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa dengan cara menghambat terbentuknya peroksida lipid yang menyebabkan kerusakan pada membran spermatozoa.

Selain itu, penurunan nilai viabilitas juga dapat disebabkan karena tingginya kandungan kalsium ekstraseluler dalam susu kacang kedelai sangrai yang menyebabkan kematian spermatozoa, stress oksidatif yang dialami spermatozoa selama penyimpanan pada suhu dingin dan penurunan derajat keasaman (Susilawati, 2011). Semakin lama semen disimpan maka pHnya semakin menurun karena terjadi peningkatan asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa dalam jumlah yang besar. Pada pH rendah (asam) dapat menyebabkan penurunan metabolim rate (MR) spermatozoa (Ismaya et al., 2008). Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. Penggunaan ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 5% yang mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer sitrat-kuning telur telah dilaporkan Fafu et al. (2016), begitu pula Gena et al. (2020) menyatakan bahwa penambahan 1% ekstrak etanol daun kelor dalam pengencer air buah lontar mampu mempertahankan kualitas spermatozoa babi landrace pada suhu 22°C.

Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Bonet et al. (1993) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan fisik pada spermatozoa yang terjadi saat pembentukan spermatozoa dalam tubuli seminiferi maupun karena proses perjalanan spermatozoa melalui saluran organ kelamin jantan. Penilaian abnormalitas pada sel sperma sangat penting untuk menentukan apakah sperma yang dipreservasi masih layak digunakan untuk inseminasi buatan. Hal ini disebabkan sperma yang abnormal tidak mampu membuahi sel telur (Afiati et al., 2015). Abnormalitas yang ditemukan dalam penelitian ini merupakan abnormalitas sekunder, seperti ekor patah atau putus. Abnormalitas sekunder kemungkinan disebabkan karena kesalahan dalam preparasi atau ejakulasi. Abnormalitas pada ekor dapat disebabkan karena ejakulasi yang tidak sempurna dan shock pada suhu. Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan cara pewarnaan differensial menggunakan pewarna eosin-negrosin dan diamati di bawah mikroskop. Rerata abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase abnormalitas spermatozoa babi landrace

Jam Pengamatan	Level ekstrak etanol daun kelor (%)				P-value
	P0	P1	P2	P3	
Semen Segar	4,0 ± 0,40	4,0 ± 0,40	4,0 ± 0,40	4,0 ± 0,40	
0	4,00±0,52 ^a	3,97±0,53 ^a	4,06±0,46 ^a	4,04±0,39 ^a	0,99
8	4,43±0,14 ^a	4,34±0,15 ^a	4,55±0,17 ^a	4,49±0,25 ^a	0,46
16	4,76±0,35 ^a	4,74±0,26 ^a	4,75±0,31 ^a	4,69±0,36 ^a	0,99
24	5,22±0,32 ^a	5,19±0,39 ^a	5,17±0,32 ^a	5,20±0,26 ^a	0,99
32	5,82±0,60 ^a	5,88±0,63 ^a	5,79±0,65 ^a	5,74±0,61 ^a	0,99
40	7,07±0,83 ^a	6,85±0,56 ^a	7,03±0,87 ^a	7,02±0,74 ^a	0,98
48	7,91±0,69 ^a	7,72±0,64 ^a	7,95±0,55 ^a	8,05±0,57 ^a	0,92

Keterangan: Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Data Tabel 3. menunjukkan bahwa penambahan EEDK dalam pengencer SKKS berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap abnormalitas sperma yang diamati sejak jam ke-0 sampai jam ke-48 penyimpanan. Hal ini disebabkan oleh kandungan lesitin yang terdapat dalam SKKS yang berfungsi sebagai anti kejut dingin mampu menjaga bentuk normal spermatozoa dan tambahan antioksidan yang melindungi spermatozoa dari serangan radikal bebas dan peroksidasi lipid. Hal ini didukung oleh Berek et al. (2020) yang menyatakan bahwa cold shock dapat berkurang jika pengencer yang digunakan mengandung lipoprotein dan lesitin.

Peningkatan angka abnormalitas disebabkan tidak hanya pada saat pembuatan preparat, sebelum dilakukan pengamatan namun juga disebabkan oleh adanya peroksidasi lipid (Suyadi et al., 2012). Selain itu juga dapat disebabkan oleh adanya kejutan dingin dan perubahan pH pengencer yang terjadi selama penyimpanan (Afiati et al., 2015). Faktor lain yang ikut berperan adalah umur sperma yang semakin tua menyebabkan peningkatan abnormalitas (Solihati, 2008).

Abnormalitas pada keempat perlakuan berada pada kisaran normal yakni berkisar antara 6,84%-7,06% pada jam ke-40 penyimpanan. Hal ini menunjukkan bahwa semua perlakuan yang dirancang baik pada perlakuan SKKS tunggal maupun dengan penambahan EEDK dapat menjaga tingkat abnormalitas pada kisaran yang normal (berada di bawah 20%) dan memenuhi syarat digunakan untuk keperluan inseminasi buatan (Krisnaningsih, 2017). Rezki et al. (2016) menyatakan bahwa membran plasma pada spermatozoa berperan sebagai pelindung, ketika sel mengalami kerusakan akan mengganggu proses metabolisme (Bunga et al., 2014).

Pengaruh Perlakuan terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Daya tahan hidup (DTH) spermatozoa merupakan kemampuan spermatozoa untuk tetap bertahan hidup selama motilitasnya masih layak untuk inseminasi buatan. Menurut Hine et al. (2014) daya tahan hidup spermatozoa yang dimaksud adalah kemampuan spermatozoa untuk bergerak progresif dalam kurun waktu tertentu setelah penyimpanan in vitro. Daya tahan hidup spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Daya tahan hidup spermatozoa babi landrace

Perlakuan	Daya Tahan Hidup (Jam)
P0	31,89±4,07 ^c
P1	39,42±4,17 ^{ab}
P2	41,68±5,16 ^a
P3	33,76±3,78 ^{bc}
P-Value	0,02

Keterangan: Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap daya tahan hidup spermatozoa. Daya tahan hidup spermatozoa dalam pengencer SKKS yang disuplementasi EEDK memiliki daya tahan hidup yang lebih lama daripada kontrol (tanpa penambahan EEDK).

Daya tahan hidup spermatozoa secara signifikan lebih tinggi ($P<0,05$) pada perlakuan P2 yaitu 41,68 jam daripada P0, P1 dan P3. Pada perlakuan P0 (kontrol) memiliki daya tahan hidup yang rendah berkaitan dengan persentase motilitas yang telah rendah ($<40\%$) pada jam ke-32. Hal ini dapat disebabkan karena kandungan kalsium yang cukup tinggi pada susu kacang kedelai sangrai yang mempengaruhi sensitifitas

spermatozoa terhadap kejutan dingin. Kejutan dingin dapat menyebabkan kerusakan membran sel secara langsung pada struktur dan fungsi seluler. Pengaruh utama dari kejutan dingin terhadap spermatozoa adalah penurunan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran.

Tingginya DTH pada perlakuan P2 berkaitan erat dengan persentase motilitas spermatozoa yang lebih tinggi pada perlakuan tersebut dibandingkan dengan P0, P1 dan P3. Penyebab hal ini diduga karena adanya tambahan nutrisi dan antioksidan yang terkandung dalam SKKS dan EEDK sehingga dapat melindungi sperma terhadap kejutan dingin yang dialami selama penyimpanan (Rosmaidar et al., 2013). Keberadaan antioksidan dalam EEDK memberikan kontribusi terhadap peningkatan DTH spermatozoa melalui perannya dalam menetralkan radikal bebas yang berpotensi merusak membran dan DNA spermatozoa. Demikian pula dengan kandungan lesitin yang terdapat dalam SKKS sangat bermanfaat sebagai pelindung sperma selama penyimpanan pada suhu dingin.

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa penambahan ekstrak etanol daun kelor dalam pengencer susu kacang kedelai dapat menekan laju penurunan kualitas sperma selama penyimpanan *in vitro*. Perlakuan yang mendapat penambahan ekstrak etanol daun kelor menghasilkan kualitas sperma yang lebih tinggi daripada perlakuan kontrol (tanpa penambahan ekstrak etanol daun kelor) dengan level ekstrak etanol daun kelor terbaik adalah 3 %.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan ekstrak etanol daun kelor sebanyak 3% dalam pengencer susu kacang kedelai sangrai lebih efektif dalam mempertahankan kualitas spermatozoa babi landrace.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of Egg yolk during the freezing step of Cryopreservation on the viability of goat Spermatozoa. *Theriogenology*.
- Afiati F, Yulnawati MR, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas Sperma Domba dengan Frekuensi Penampungan Berbeda. *Pros Sem Nas Biodiv Indon*.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, dan Anton M. 2004. Bull Semen *in vitro* Fertility after Cryopreservation Using Egg Yolk LDL: a Comparasion with Optidyl, a Commercial Egg Yolk Extender. *Theriogenology*.
- Anghel, A.H., S.Zamfirescu and D. Coprean. 2009. Influence of Vitamin E on Microscopic and Oxidative Parameters of Frozen-Thawed Ram Semen. *Lucrari Stiintifice*.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME, 2000. Semen evaluation. In: Hafez B. Hafez ESE, editor. *Reprod in Farm Anim*. 7th Ed. Philadelphia (US): Lippincott Williams and Wilkins.
- Barek ME, Hine TM, Nalley WM, Belli HLL. 2020. Pengaruh Penambahan Sari Wortel dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Bligon. *Jurnal Nukleus Peternakan*.
- Bergeron, A. and P. Manjunath. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod*.
- Blegur J, Nalley WM, Hine TM. 2020. Pengaruh penambahan virgin coconut oil dalam pengencer Tris kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi bali selama preservasi *Jurnal Nukleus Peternakan*.
- Bonet, S., M. Briz. and A. Fradera. 1993. Ultrastructural Abnormalities of Boar Spermatozoa. *Theriogenology*.
- Bunga VD, Susilawati T, Wahjuningsih S. 2014. Kualitas Semen Sapi Limousin pada Pengencer yang Berbeda Selama Pendinginan. *Ternak Tropikal Journal of Tropical Animal Production*.
- Campell, N.A., J.B. Reece and L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Ed Ke-5. Jilid I. Erlangga. Jakarta.

- Fafo M, Hine TM, Nalley WM. 2016. Pengujian Efektivitas Ekstrak Daun Kelor dalam Pengencer Sitrat-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Babi Landrace. *Jurnal Nukleus Peternakan*.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals*. E.S.E. Hafez (Eds.). 6th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Gena M.G.G, Foeh N.D.F.K dan Gaina.C.D. 2020. Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) sebagai Antioksidan dalam Pengencer Semen Babi Landrace Berbasis Air Buah Lontar. *Jurnal Veteriner Nusantara*.
- Gil, J., M. R. Irazoqui, N. Lundeheim, L. Soderquist and H. R. Martinez. 2003. Fertility of Ram Semen Frozen in Bioxcell and Trialdyla Extender for Cryopreservation of Bull Semen. *Animal Reproduction*.
- Gogol, P. and A. Wierzchos-Hilczner. 2009. Membrane Integrity, Energy Status and Motility of Rabbit Spermatozoa Stored for 2 Days at 15°C. *J. Anim.*
- Hafez. 2000. Spermatozoa dan Seminal Plasma. Dalam: B. Hafez dan E. S. E. Hafez (Eds). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
- Hammerstedt, R.H. 1993. Maintenance of Bioenergetic Balance in Sperm and Prevention of Lipid Peroxidation : a Review of the Effect on Design of Storage Preservation System. *Reprod Fertil*.
- Herdis MR, Toelihere I, Supriatna B, Purwantara dan Adikara. 2005. Optimalisasi Kualitas Semen Cair Domba Garut (*Ovis aries*) melalui Penambahan Maltosa ke dalam Pengencer Semen Tris-Kuning Telur. *Media Kedokteran Hewan*.
- Hidayaturrahmah H. 2018. Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa. *Bioscientiae*.
- Hine TM, Burhanudin, Marawali A. 2014. Efektivitas Air Buah Lontar dalam Mempertahankan Motilitas, Viabilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*.
- Immelda KH, Susilowati S, Yudaniyanti IS. 2019. Pengaruh bahan pengencer sari kacang kedelai (*Glycine max*) terhadap viabilitas dan nekrosis spermatozoa domba Sapudi. *Ovozoa Journal of Animal Reproduction*.
- Ismaya. Kustono, S. Bintara dan D.T. Widayati. 2008. *Teknologi Reproduksi Ternak*. Fakultas Peternakan. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Johnson, L.A., K.F. Weitze, P. Fiser and W.M.C. Maxwell. 2000. Stronge of boar semen. *J Anim Sci*.
- Khalifa, T.A.A. and B.E. El-Saidy. 2006. Pellet-Freezing of Damascus Goat Semen in a Chemically Defined Extender. *Anim Reprod*.
- Krisnaningsih ATN, Ama KT, Kusumawati ED. 2017. Kualitas Spermatozoa Semen Sexing Kambing Peranakan Etawah (PE) dengan Metode Sedimentasi Putih Telur Menggunakan Pengencer yang Berbeda. *Jurnal Sains Peternakan*.
- Kulaksiz R, Cebi C, Akcay E, dan Daskin A. 2010. The Protective Effect of Egg Yolk from Different Avian Species During the Cryopreservation of Karayaka Ram Semen. *Small Ruminant Research*.
- Kurniasih. 2013. *Khasiat dan Manfaat Daun Kelor Untuk Penyembuhan Berbagai Penyakit*. Yogyakarta: Pustaka Baru Press.
- Maxwell WMC, Watson PF. 1996. Recent Progressn the Preservation of Ram Semen. *Anim Repro*.
- Ogbuewu, I.P., N.O. Aladi, I.F. Etuk, M.N. Opara, M.C. Uchegbu, I.C. Okoli, and M.U. Iloeje. 2010. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res. J. Vet. Sci*.
- Paulenz, H.,E. Kommisrud dan P.O. Hofmo. 2000. Effect on the long-term stronge bat different tempertures on the quality of liquid boar semen. *Reprod. Dom. Anim*.
- Rahayu W, Agung Praman WM, Ciptadi G. 2014. Kualitas Semen Segar Kambing Boer pada Temperatur Penyimpanan 4°C dengan Menggunakan Pengencer Sitrat dan Suplementasi Susu Kedelai Bubuk. *Biotropika:Journal of Tropical Biology*.
- Rezki ZM, Sansudewa D, Ondo YS. 2016. Pengaruh Pengencer Kombinasi Sari Kedelai dan Tris

- terhadap Kualitas Mikroskopis Spermatozoa Pejantan Sapi PO Kebumen. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*.
- Roof, D.J., S. Bowley, L.L. Price, and D.J. Matsas. 2012. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*.
- Rosmaidar, Dasrul, Lubis TM. 2013. Pengaruh Penambahan Sari Buah Tomat dalam Pengencer terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 3-5°C. *Jurnal Ilmiah Peternakan*.
- Siregar, H. J. 2009. Pengaruh Pemberian Vitamin C Terhadap Jumlah Sel Leydig Dan Jumlah Sperma Mencit Jantan Dewasa yang Dipapari MSG. M. Biomed Tesis. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Situmorang P, Triwulaningsih E, Lubis A, Caroline W, Sugiarti T. 2000. Pengaruh Proline, Cartine terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa yang Disimpan pada Suhu 5°C (Chiling Semen). *Jurnal Ilmu Ternak Veteriner*.
- Solihati Nurcholidah dan Kune Petrus. 2009. Pengaruh Jenis Pengencer terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simmental. Fakultas Peternakan Universitas Padjajaran. Bandung.
- Sreelatha S, and Padma, PR. 2009. Antioxidant Activity and Total Phenolic of Moringa oleifera Leaves in Two Stage of Maturity. *Plant Foods Hum Nutr*.
- Sukonbi, O. A., O. S. Anjani, A. A. Lawanson and E. A. Amao. 2015. Antibiotic Potential of Moringa Leaf (*Moringa oleifera* Lam) Crude Extractin Bull Semen Extender. *European Journal of Medicinal Plants*.
- Susilawati T. 2013. Pedomam Inseminasi Buatan pada Ternak. Universitas Brawijaya Press.
- Suyadi A, Rachmawati IN. 2012. Pengaruh α -Tocopherol yang berbeda pada Pengencer dasar TrisAminomethane Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 5°C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*.
- Tamoes JA, Nalley WM, Hine TM. 2014. Fertilitas spermatozoa babi landrace Dalam pengencer modifikasi zorlesco Dengan susu kacang kedelai. *J Sains Peternakan*.
- Thun, R., M. Hurtado, and F. Janet. 2002. Comparison of Biochupos-Plus® and tris egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*.
- Wibisono, H. 2010. Panduan Laboratorium Andrologi. PT Refika Aditama. Bandung.