

Perbandingan Kualitas Sperma Babi *Landrace* dalam Pengencer *Beltsville Thawing Solution*, *Mulberry III*, dan *Sperm Life* yang Ditambahkan Ekstrak Etanol Daun Kelor

(COMPARISON OF THE LANDRACE PIG SPERM QUALITY IN BELTSVILLE THAWING SOLUTION, MULBERRY III, SEMEN LIFE COMBINED WITH THE ETHANOL EXTRACT OF MORINGA LEAVES)

**Wilmientje Marlene Nalley, Aloysius Marawali,
Kirenus Uly, Petrus Kune, Franky M.S. Telupere,
Ni Made Paramita Setyani, Alvrado Bire Lawa,
Yustiani Yuliana Bette, Thomas Mata Hine***

Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan,
Universitas Nusa Cendana
Jl. Adisucipto, Penfui, Kota Kupang,
Nusa Tenggara Timur, Indonesia 85148.
Telp: (0380) 881580

*e-mail: thomasmatahine@staf.undana.ac.id

Abstract

Beltsville Thawing Solution (BTS) is a common diluent used in the preservation of pig sperm. However, its capacity to preserve sperm motility and longevity, is severely limited. One of the reasons is the diluent lacks antioxidants in sufficient amounts to counteract the harmful effects of free radicals. The objective of the study was aimed to evaluate the efficaciousness of BTS, Mulberry III (MIII) and Sperm Life diluents in conjunction with Moringa leaf ethanol extract (MLe2) for the preservation of landrace pigs' sperm. Semen was collected from one landrace boar aged 2.9 years. Semen evaluation was performed both macroscopically and microscopically, and good quality semen was split into three tubes and diluted with BTS, MIII and Sperm Life diluent, to which 4% MLe2 had been added. Semen preservation was done in a cool box at a temperature of 18-20°C and every eight hours, sperm motility, viability, intact- plasma membrane and acrosomal were assessed. Data were analyzed using analysis of variance and continued with the Duncan Test. The study's findings demonstrated that, in comparison to Sperm Life, BTS and MIII diluents added with MLe2 produced sperm of higher quality. It was concluded that BTS and MIII diluents enriched with E2dk were more effective than Sperm Life in maintaining the sperm quality of landrace pigs.

Keyword: BTS; MIII; Sperm Life; boars sperm; moringa leaves ethanol extract

Abstrak

Beltsville Thawing Solution (BTS) merupakan salah satu pengencer yang sudah umum digunakan untuk preservasi sperma babi. Namun demikian, pengencer ini memiliki kemampuan yang sangat terbatas dalam mempertahankan motilitas dan daya tahan hidup sperma. Salah satu penyebabnya adalah pengencer ini tidak mengandung antioksidan yang cukup sehingga tidak dapat menangkal pengaruh negatif dari radikal bebas. Penelitian ini

bertujuan membandingkan efektivitas pengencer BTS, *mulberry* III (MIII), dan Sperm Life yang disuplementasi dengan ekstrak etanol daun kelor (E2dk) untuk preservasi sperma babi *landrace*. Semen ditampung dari satu ekor babi jantan *landrace* umur 2,9 tahun. Evaluasi semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis, semen yang berkualitas baik dibagi ke dalam tiga tabung untuk diencerkan dengan pengencer BTS, MIII, dan Sperm Life yang telah ditambahkan E2dk 4%. Preservasi semen dilakukan dalam *cool box* suhu 18-20°C, setiap delapan jam dilakukan evaluasi terhadap motilitas, viabilitas, membran plasma utuh (MPU), dan tudung akrosom utuh (TAU) sperma. Data dianalisis dengan uji sidik ragam dan dilanjutkan dengan Uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer BTS dan MIII yang telah ditambahkan dengan E2dk menghasilkan kualitas sperma yang lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer Sperm Life. Disimpulkan bahwa pengencer BTS dan MIII yang diperkaya dengan E2dk lebih efektif dibandingkan dengan Sperm Life dalam mempertahankan kualitas sperma babi *landrace*.

Kata-kata kunci: BTS; MIII; Sperm Life; sperma babi; ekstrak etanol daun kelor

PENDAHULUAN

Pengenceran semen merupakan salah satu metode dalam tahapan teknologi inseminasi buatan (IB) yang bertujuan untuk memperbanyak volume semen serta memperpanjang daya hidup sperma untuk dapat digunakan dalam suatu periode waktu yang lebih panjang. Volume semen yang lebih banyak memungkinkan lebih banyak ternak betina yang dapat diinseminasi dalam satu ejakulat. Daya hidup dan motilitas sperma sangat bergantung pada komposisi bahan pengencer yang digunakan. Pengencer yang baik harus dapat melindungi sperma terhadap kejutan dingin, mengandung energi untuk motilitas sperma, mengandung antioksidan untuk menangkal radikal bebas yang dapat merusak sperma, sebagai *buffer* dan dapat mencegah pertumbuhan kuman.

Beltsville Thawing Solution (BTS) merupakan salah satu pengencer yang sudah umum digunakan untuk preservasi sperma babi, namun dalam penggunaannya di lapangan pengencer ini hanya dapat mempertahankan motilitas sperma yang layak untuk IB hanya sekitar 48 jam (Nalley 2018). Pengencer ini tidak mengandung antioksidan yang berfungsi untuk menangkal pengaruh negatif dari radikal bebas yang diproduksi secara berlebihan selama preservasi sperma.

Beberapa studi menunjukkan bahwa daun kelor mengandung beberapa senyawa antioksidan seperti alkaloid, flavonoid, tanin, vitamin C, vitamin E, dan steroid (Gopalakrishnan *et al.*, 2016). Senada dengan temuan tersebut, Kasolo *et al.* (2010) menyatakan bahwa ekstrak daun kelor merupakan salah satu bahan alami yang dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas sperma. Daun kelor mengandung antioksidan yang tinggi (Kasolo *et al.*, 2010) dan kandungan senyawa daun kelor juga bersifat anti-bakteri (Das *et al.*, 2012). Menurut Kumala *et al.* (2016) daun kelor mengandung flavonoid yang bersifat sebagai antioksidan, sehingga mampu mengikat radikal bebas.

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengencer BTS dengan dua pengencer yaitu *mulberry* III (MIII) dan *Sperm Life*. Ketiga pengencer tersebut ditambahkan dengan ekstrak etanol daun kelor. Senyawa yang terkandung di dalam ekstrak daun kelor dapat memperkecil kerusakan sperma selama preservasi, sehingga kualitasnya diharapkan dapat dipertahankan dan dapat digunakan untuk IB lebih lama.

METODE PENELITIAN

Materi penelitian

Materi penelitian ini adalah semen segar yang ditampung dari satu ekor babi

jantan *landrace* yang berumur 2,9 tahun dan sudah terlatih. Babi dipelihara dalam kandang individu dan diberi pakan berupa konsentrat 3,5 kg/ekor/hari dengan kandungan protein kasar 15-16% dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Metode Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas tiga perlakuan pengenceran sperma yakni *Beltsville Thawing Solution*, (BTS), *Mulberry III* (MIII) dan *Sperm Life*, dan ketiga pengencer tersebut ditambahkan dengan ekstrak etanol daun kelor (E2dk) 4%, masing-masing perlakuan diulang lima kali sehingga terbentuk 15 unit percobaan.

Ekstraksi Etanol Daun Kelor

Daun kelor yang telah dipisahkan dari tangkai dicuci, kemudian ditiriskan untuk menghilangkan air dari proses pencucian. Terhadap daun kelor dilakukan *blanching* pada suhu 70°C selama 5 menit. Proses dilanjutkan dengan pengeringan dengan dehidrator pada suhu 60°C hingga daun kering, kemudian dilakukan penggilingan atau pengecilan ukuran daun kelor kering. Tepung daun kelor setelah penggilingan diayak untuk mendapatkan tepung yang lebih halus. Tepung hasil ayakan selanjutnya dilakukan maserasi menggunakan etanol 70%. Filtrat hasil saringan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu maksimal 50°C selama 24 jam untuk menghasilkan fraksi kasar berupa ekstrak cair yang pekat. Ekstrak tersebut kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C hingga saatnya digunakan (Dahril, 2021).

Persiapan Pengencer

Bahan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah BTS[®] dan MIII[®] (Minitube GmbH, Tiefenbach, Jerman) dan Sperm Life[®] (Intec Inc, Toyama, Jepang). Sebanyak 50 g BTS[®], 60 g MIII[®], dan 50 g Sperm Life[®], masing-masing diencerkan dengan aqua-dest hingga 1000 mL. Larutan pengencer tersebut setelah dicampur hingga

homo-gen, disimpan pada suhu 37°C (Foeh *et al.*, 2017).

Penampungan dan Evaluasi Semen

Penampungan semen dilakukan dua kali seminggu menggunakan metode pijat tangan bersarung (*hand glove massage*). Penis akan keluar pada saat babi jantan tersebut menaiki betina tiruan (*dummy sow*). Segera penis yang menyembul ke-luar dari kulup/prepusium digenggam sambil melakukan pemijatan dan diarahkan ke permukaan tabung penampung yang telah dilengkapi dengan kain kasa untuk menyaring fraksi gelatinnya. Pija-tan/*massage* dilanjutkan hingga terjadi ejakulasi dan babi jantan turun dari *dummy sow*.

Semen yang diperoleh, dievaluasi secara makroskopis terhadap volume, warna, konsistensi dan pH semen. Volume semen segar diukur menggunakan skala pada tabung penampung semen. Warna dievaluasi secara visual dan pH diukur menggunakan kertas indikator pH (Merck scale 6,4-8,0[®], Merck, New Jersey, Amerika erikat). Evaluasi secara mikroskopis dilakukan terhadap variabel motilitas, viabilitas, konsentrasi dan morfologi sperma, membrane plasma dan tudung akrosom utuh. Evaluasi mikroskopis terhadap motilitas, viabilitas dan morfologi sperma menggunakan mikroskop (Olympus C31[®], Olympus, Tokyo, Jepang) dengan perbesaran 10x40. Motilitas spermatozoa dinilai secara subjektif dengan mem-bandingkan pergerakan sperma yang progresif dengan yang tidak progresif (bergerak ditempat (*vibrator*), mundur, melingkar dan tidak bergerak), nilai dinyatakan dalam persen.

Viabilitas sperma dihitung dengan cara mewarnai sperma dengan pewarna eosin-nigrosin. Sperma hidup pada bagian kepala yang tidak terwarnai eosin-nigrosin (transparan), sedangkan sperma yang mati akan menyerap warna. Proporsi sperma yang hidup dan mati dihitung minimal 200 sel dari 10 lapang pandang pengamatan di bawah mikroskop dengan pem-besaran 10x40. Sperma yang hidup adalah jumlah

sperma hidup dibagi dengan sperma hidup dan mati (total sperma) dikali 100%.

Morfologi sperma dievaluasi menggunakan pewarnaan carbofuchsin, (Arifiantini, 2012). Morfologi sperma terbagi atas sperma normal dan sperma abnormal. Sperma abnormal diklasifikasikan berdasarkan abnormalitas primer dan sekunder. Konsentrasi sperma dievaluasi dengan menghitung menggunakan Ruang Neu-bauer yang diencerkan 100 kali (10 μ L semen dalam 2 mL NaCl 3%) (Arifiantini, 2012).

Membran plasma utuh (MPU) diperiksa menggunakan larutan *hypo-osmotic swelling test* (HOS). Larutan HOS disediakan dengan mencampurkan 0,9 g fruktosa dan 0,49 g sodium sitrat, dilarutkan dengan akuades hingga volume 100 mL. Semen sebanyak 10-20 μ L dicampur dengan 1000 HOS μ L larutan HOS, dihomogenkan kemudian diinkubasi selama 30-45 menit pada suhu 37°C, hitung minimal 200 sperma secara acak dari 10 lapang pandang. Sperma yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau menggelembung, sedangkan sperma dengan membran plasma rusak ditandai dengan ekor yang lurus (Arifiantini, 2012).

Tudung akrosom utuh (TAU) dievaluasi dengan menggunakan larutan formalin yang terbuat dari NaCl fisiologis ditambah 1% formalin yang berfungsi mematikan dan memfiksasi sperma. Setetes semen dicampurkan dengan larutan TAU perbandingan 1:100, diamkan selama 1 jam. Pengamatan dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda, minimal terhitung 200 sperma. Sperma-tozoa dengan tudung akrosom yang utuh ditandai dengan 1/2 sampai 2/3 bagian anterior kepala berwarna lebih gelap bila dibandingkan dengan

bagian posterior. Semen yang memenuhi syarat untuk digunakan adalah memiliki motilitas sperma di atas 70% dan konsentrasi di atas 200x10⁶ sel/mL dengan abnormalitas di bawah 20%.

Pengenceran dan Preservasi Semen

Larutan pengencer (BTS[®], MIII[®] dan Sperm Life[®]) dicampur dengan E2dk dengan level 0, 2, 4, dan 6% hingga homogen. Semen segar diencerkan ke dalam pengencer dengan perbandingan satu bagian semen dan tiga bagian pengencer. Semen cair dimasukkan ke dalam tabung mikro, dan diberi label sesuai perlakuan. Preservasi dalam *cool box* yang bersuhu 18-20°C yang dikontrol dengan termometer. Pengamatan kualitas semen dilakukan setiap 8 jam hingga persentase motilitas progresif sperma mencapai 40% sesuai (BSN, 2014)

Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh dianalisis dengan uji sidk ragam dan dilanjutkan dengan Uji Duncan dengan bantuan *software SPSS 25.0 for windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas semen segar babi *landrace* yang diperoleh dari lima kali penampungan ditampilkan pada Tabel 1. Data pada Tabel 1, menunjukkan kualitas semen yang baik dan layak digunakan untuk preservasi. Kelayakan tersebut berdasarkan hasil evaluasi secara makros-kopis (volume, warna, konsistensi dan pH semen) maupun secara mikros-kopis (konsentrasi, motilitas, viabilitas, MPU dan TAU).

Tabel 1. Data semen segar babi *landrace*

Variabel	Penampungan					Rerata ± SD
	1	2	3	4	5	
Volume (mL)	155	180	140	165	178	163,60 ± 16,65
Warna	Putih	Puih	Putih	Putih	Putih	-
Konsistensi	Susu	Susu	Susu	susu	Susu	-
Ph	Sedang	Sedang	Sedang	Encer	Encer	-
Konsentrasi (10 ⁶)	6,7	6,7	6,7	6,4	6,7	6,64 ± 0,13
Motilitas (%)	289	248	266	271	239	262,60 ± 19,68
Viabilitas (%)	80	75	75	75	75	76,00 ± 2,24
Abnormalitas (%)	92,11	87,33	89,39	90,21	91,42	90,09 ± 1,87
MPU (%)	3,44	3,80	3,15	4,23	4,19	3,76 ± 0,47
TAU (%)	92,87	89,65	90,78	92,41	91,11	91,36 ± 1,29
TAU (%)	91,92	89,27	91,06	91,79	90,95	91,00 ± 1,06

Volume semen babi *landrace* yang digunakan pada penelitian ini berkisar antara 140 hingga 180 mL. Volume tersebut masuk ke dalam kategorikan sedang dan masih berada dalam rentangan volume semen yang layak digunakan untuk IB. Volume semen yang ditampung menggambarkan kemampuan produksi dari testis dan kelenjar kelamin pe-lengkap/aksesoris yakni kelenjar vesikulares, kelenjar ampula dan kelenjar prostat. Volume semen yang berada di bawah 200 mL mengindikasikan bahwa babi yang digunakan sebagai sumber semen sering digunakan untuk penampungan semen. Ternak jantan semakin sering dilakukan penampungan maka volume semen yang dihasilkan juga akan semakin sedikit. Volume semen yang diperoleh juga berkaitan erat dengan tingkat rangsangan yang diterima oleh seekor pejantan. Rangsangan yang diperoleh seekor pejantan semakin intens maka kontraksi otot di sekitar kelenjar kelamin pelengkap dan epididymis juga akan semakin kuat. Rangsangan tersebut selanjutnya mendorong plasma semen dan sperma yang ada di dalamnya ke arah penis. Volume semen pada penelitian ini lebih tinggi daripada hasil penelitian yang dilaporkan Marlize *et al.* (2021) pada babi *landrace* yakni 119 mL.

Warna semen tergolong normal pada ternak babi dan berkaitan erat dengan konsistensi serta konsentrasi sperma. Warna semen pada ternak babi umumnya

putih susu, dengan konsistensi encer hingga sedang, dan konsentrasi sperma berada di bawah 500 juta per mililiter. Rendahnya konsentrasi sperma pada babi disebabkan jumlah cairan yang dihasilkan oleh kelenjar kelamin pelengkap yang banyak jika dibandingkan dengan ternak ruminansia. Tingkat keasaman (pH) semen juga termasuk normal karena berada sedikit di bawah pH netral, yang sangat dipengaruhi oleh keseimbangan unsur-unsur yang terlarut di dalam plasma semen terutama ion hydrogen dan karbonat.

Motilitas, viabilitas, MPU, TAU spermatozoa tergolong tinggi yakni berada di atas 75% yang mengindikasikan bahwa semen yang ditampung sebanyak lima kali penampungan memiliki kualitas yang sangat layak untuk diproses selanjutnya. Hasil penelitian ini berbeda dengan laporan Mega *et al.* (2022) yakni motilitas 70%, viabilitas 85,82% dan MPU sperma 86,65%.

Motilitas dan Viabilitas Sperma Babi *Landrace*

Motilitas dan viabilitas sperma babi *landrace* pada setiap pengencer per-lakuan ditampilkan pada Tabel 1 dan 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan persentase motilitas dan viabilitas sperma selama penyimpanan dan kecepatan penurunan tersebut sangat bervariasi antar perlakuan (Harrison *et al.*, 1996). Faktor-faktor seperti pH, konsen-trasi dan jenis ion, tekanan osmotik dari medium pengencer

sangat memengaruhi kehidupan dan motilitas sperma selama penyimpanan (Watson, 1990).

Terjadinya penurunan tersebut disebabkan oleh sejumlah faktor seperti lama simpan sperma. Lama simpan sperma menyebabkan penuaan sel (*aging*), nutrisi berkurang dan ROS sperma tidak dapat bergerak dan mati. Semen babi pada penelitian ini disimpan pada suhu 18 hingga 20°C sehingga proses metabolisme tetap berlangsung walaupun dalam tingkat yang lebih rendah. Suhu penyimpanan semen babi berbeda dengan semen ternak ruminansia. Hal tersebut karena membran plasma sperma babi memiliki kandungan asam lemak tidak jenuh yang lebih tinggi sehingga lebih rentan terhadap suhu dingin (Paulenz *et al.*, 2001; Schulze *et al.*, 2013).

Penurunan motilitas dan viabilitas sperma juga dapat terjadi akibat semakin menipisnya kandungan nutrisi atau substrat energi di dalam pengencer, semakin lama penyimpanan maka semakin banyak nutrisi yang digunakan oleh sperma untuk metabolismenya sehingga semakin sedikit substrat energi yang tersisa. Energi utama yang digunakan oleh sperma adalah adenosin triphosphate (ATP) yang berasal dari hasil metabolisme glukosa dan fruktosa (Rigau *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2013).

Hasil pengamatan pada jam ke-0 hingga ke-16 penyimpanan menunjukkan bahan pengencer yang digunakan belum memengaruhi motilitas dan viabilitas sperma ($p > 0,05$). Perbedaan yang nyata baru terlihat pada jam ke-24 hingga jam ke-48. Pengencer BTS dan MIII menunjukkan motilitas dan viabilitas sperma yang lebih tinggi daripada pengencer sperm life ($p < 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa kedua pengencer yang disebutkan pertama memiliki kandungan nutrisi dan bahan pelindung yang lebih tinggi yang dapat dimanfaatkan oleh sperma untuk bergerak dan mempertahankan kehidupannya selama berada dalam lingkungan *in vitro*.

Kandungan nutrisi di dalam ketiga pengencer tersebut tidak tertulis secara lengkap, namun dari sejumlah artikel di-

nyatakan bahwa BTS mengandung glukosa, EDTA, sodium citrate, sodium bicarbonate, dan potassium chloride (Du-be *et al.*, 2004; Thompson, 2005), sedangkan MIII mengandung *bovine serum albumin* (BSA) dan glisin.

Glukosa berperan sebagai substrat energi untuk pergerakan dan kehidupan sperma melalui proses metabolisme yang menghasilkan adenosin triphosphate (ATP). Fungsi potassium adalah melindungi pompa sodium potassium dan mencegah terjadinya pergeseran pompa potassium intraseluler yang dapat menyebabkan gangguan fungsi transportasi ion serta metabolisme sel spermatozoa. Senyawa EDTA telah digunakan pada beberapa penelitian untuk meningkatkan fungsi sperma. Aktivitas spermidin dan efek tersebut bergantung waktu dan dosis EDTA yang diberikan. Senyawa EDTA juga berfungsi sebagai pengikat kalsium, karena peningkatan kalsium intraseluler dapat menyebabkan kerusakan membran sel sperma. Penggunaan EDTA sebesar 10 dan 100 $\mu\text{l/mL}$ dapat meningkatkan motilitas progresif sperma (Chi *et al.*, 2008). Kandungan EDTA dalam pengencer juga dapat berperan dalam mengurangi reaksi akrosom melalui pengurangan kadar kalsium pada medium pengencer sperma (Anel *et al.*, 2010).

Senyawa BSA dan glisin yang terkandung di dalam pengencer MIII berfungsi mencegah perubahan pH dan tekanan osmotik serta melindungi spermatozoa selama proses preservasi, sedangkan glisin berperan sebagai sumber protein penting bagi spermatozoa (Johnson *et al.*, 2000). Senyawa BSA yang ditambahkan ke dalam pengencer Modena dapat menurunkan stress oksidatif dan meningkatkan kualitas sperma babi selama penyimpanan *in vitro* pada suhu 17°C (Zhang *et al.*, 2015).

Penelitian ini menunjukkan bahwa jenis pengencer semen yang digunakan berpengaruh terhadap karakteristik motilitas (Tabel 2) sperma babi *landrace* selama penyimpanan. Hal ini sejalan dengan laporan penelitian Mapeka *et al.* (2012) yang membandingkan tiga bahan pengencer

yang berbeda yakni BTS, Kobidil + dan sitrat-kuning telur, dengan persentase motilitas sperma tertinggi dihasilkan oleh dua pengencer pertama dan terendah pada pengencer sitrat-kuning telur. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan temuan yang dilaporkan oleh Vyt *et al.* (2004), bahwa

BTS sebagai bahan pengencer yang dapat diterima untuk pre-servasi semen babi dalam jangka pendek. Pengencer BTS ini juga dapat mem-pertahankan motilitas sperma babi yang lebih baik dibandingkan dengan pengencer Androhep (Vyt *et al.*, 2004).

Tabel 2. Motilitas sperma babi landrace dalam pengencer *Beltsville Thawing Solution*, *Mulberry III* dan *Sperm Life* yang disuplementasi ekstrak etanol daun kelor

Perlakuan	Jam pengamatan						
	0	8	16	24	32	40	48
BTS	76,00±2,2 ^a	71,80±2,1 ^a	66,80±2,2 ^a	61,40±2,2 ^a	56,20±2,2 ^a	50,60±2,6 ^a	44,40±5,5 ^a
MIII	76,00±2,2 ^a	71,40±2,2 ^a	65,20±3,0 ^a	61,00±2,7 ^a	54,80±3,6 ^a	49,00±4,7 ^a	39,60±5,6 ^a
Sperm Life	76,00±2,2 ^a	71,40±2,2 ^a	62,40±5,6 ^a	55,20±3,6 ^b	46,00±4,2 ^b	36,60±4,5 ^b	27,00±5,7 ^b
P-value	1,00	0,94	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00

Superskrip yang berbeda mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P< 0,05).

Hasil penelitian berbeda dengan temuan Rienprayoon *et al.* (2012) yang melaporkan bahwa semen babi yang diencerkan dengan BTS memiliki tingkat motilitas sperma yang lebih rendah dibandingkan dengan pengencer ModenaTM. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena pengencer ModenaTM mengandung anti-oksidan yang membantu mengurangi terjadinya pengaruh negatif dari *reactive oxygen species* (ROS) selama periode penyimpanan. Senyawa ROS dapat merusak membran plasma sperma dan karenanya mengurangi tingkat motilitas sperma (Boonsorn *et al.*, 2010; Guthrie dan Welch, 2005; Chanapiwat *et al.*, 2009).

Menurut Orok *et al.* (2010) untuk preservasi sperma *in vitro*, harus tersedia lingkungan yang menghambat pembentukan ROS atau lipid peroksida yang berbahaya, dan juga mengandung bahan yang berfungsi untuk mengurangi efek kejutan dingin (*cold shock*). *Reactive oxygen species* merusak membran dan DNA sperma yang pada akhirnya mengurangi tingkat motilitas sperma (Boonsorn *et al.*, 2010).

Ketiga pengencer tersebut dalam penelitian ini ditambahkan ekstrak etanol daun kelor/E2dk sebagai antioksidan alami. Hasil penelitian sebelumnya telah membuktikan efek positif E2dk terhadap sperma, yang ditambahkan dalam bahan pengencer

untuk preservasi dan krio-preservasi sperma maupun secara oral bersama dengan air minum. Hal ini ber-kaitan erat dengan fungsinya sebagai antioksidan yang dapat mereduksi pengaruh negatif radikal bebas terhadap sperma. Moichela *et al.* (2020) melaporkan bahwa ekstrak daun kelor dapat menurunkan produksi ROS intraseluler, fragmentasi DNA dan reaksi akrosom pada sperma manusia *in vitro*. Sperma diinkubasi dengan ekstrak daun kelor (0,625; 6,25; 62,5 dan 625 µg/mL) selama 1 jam, dan dalam studi tersebut HTF-BSA berperan sebagai kontrol. Motilitas sperma, viabilitas, potensi membran mitokondria dan kapasitas tetap tidak berubah (p>0,05). Penurunan produksi ROS sperma dipengaruhi oleh dosis ekstrak daun kelor (p <0,0001), fragmentasi DNA (p<0,0001) dan reaksi akrosom (p <0,001). Peningkatan persentase sperma non-kapasitas (p<0,01) tercatat pada 625 µg/mL. Sifat antioksidan ekstrak daun kelor secara aktif menjaga fungsi dasar sperma, menghambat kelebihan produksi *free superoxide* sperma dan melindungi integritas DNA dan menurunkan kejadian reaksi akrosom.

Penelitian Shokry *et al.* (2020) mengevaluasi efektivitas ekstrak daun kelor dalam meningkatkan karakter semen segar dan kriopreservasi semen domba barkingi dibandingkan dengan kombinasi vitamin E

dan Selenium. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor yang diberikan secara oral dapat meningkatkan volume semen, kon-sentrasi sperma, aktivitas katalase plasma seminalis, glutathione peroksidase (GPx), glutathione reduktase (GR), superoksida dismutase (SOD), alkaline fosfatase (ALP), asam fosfatase (ACP), kadar asam askorbat dan kapasitas antioksidan total. Selain itu, secara signifikan meningkatkan motilitas sperma pasca *thawing*, indeks viabilitas, integritas membran, dan aktivitas enzim antioksidan sperma pasca *thawing*. Selain itu, menurunkan konsentrasi malondialdehyde (MDA) plasma semen dan kelainan akro-somal serta fragmentasi DNA sperma dalam semen pasca kriopreservasi.

Tudung Akrosom Utuh dan Membran Plasma Utuh Sperma Babi Landrace

Membran plasma sangat penting dalam kehidupan sperma karena merupakan bagian yang membungkus sperma dan melindungi sperma terhadap berbagai pengaruh dari luar sel. Membran plasma juga berperan dalam transport aktif maupun pasif dari berbagai ion dan senyawa yang penting untuk sperma seperti air, ion natrium, kalium, klor, glukosa, fruktosa,

asam amino dan ber-bagai bahan lainnya yang bermanfaat untuk sperma. Kerusakan membran plas-ma dapat menyebabkan sifat semi-permeabel dari membran plasma terganggu sehingga tidak selektif dalam menyeleksi ion atau senyawa yang masuk ke dalam sel. Hal ini dapat berdampak pada kerusakan dan kematian sel sperma.

Kerusakan tudung akrosom dapat menyebabkan kandungan akrosom beserta enzim-enzim yang terdapat di dalamnya terekspose ke luar sel. Sejumlah enzim yang terdapat di dalam akrosom berperan dalam membantu proses fertilisasi sperma pada sel telur melalui kerjanya dalam melarutkan dinding zona pelusida sebagai pembungkus paling luar dari sel telur. Hal ini berarti sperma yang memiliki tudung akrosom yang tidak utuh/intak tidak akan mampu membuahi sel telur.

Tingkat keutuhan tudung akrosom dan membran plasma sperma ditampilkan pada Tabel 4 dan 5. Pada awal penyimpanan (0-16 jam), TAU dan MPU sperma babi *landrace* menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($p>0,05$), namun setelah jam ke-24 hingga jam ke-48 terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan, dengan perlakuan terbaik adalah peng-encer BTS dan MIII ($p<0,05$) (Tabel 4 dan 5)

Tabel 4. Tudung akrosom utuh (TAU) sperma babi landrace dalam pengencer *Beltsville Thawing Solution*, *Mulberry III* dan *Sperm Life* yang disuplementasi ekstrak etanol daun kelor

Pengencer	Jam pengamatan						
	0	8	16	24	32	40	48
BTS	90,85±0,8 ^a	84,18±1,1 ^a	76,28±4,6 ^a	72,42±2,0 ^a	66,16±3,1 ^a	61,99±3,7 ^a	55,90±2,0 ^a
MIII	90,65±0,9 ^a	82,27±1,5 ^b	75,62±3,7 ^a	70,80±3,5 ^a	63,10±4,2 ^a	58,00±5,6 ^a	50,24±7,4 ^a
Sperm Life	91,06±0,8 ^a	80,89±1,4 ^b	72,63±8,3 ^a	63,74±2,8 ^b	53,82±7,1 ^b	45,25±6,0 ^b	35,07±6,4 ^b
P-value	0,75	0,00	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00

Superskrip yang berbeda mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P<0,05$).

Tabel 5. Membran Plasma Utoh sperma babi landrace dalam pengencer *Beltsville Thawing Solution*, *Mulberry III* dan *Sperm Life* yang disuplementasi ekstrak etanol daun kelor

Pengencer	Jam pengamatan						
	0	8	16	24	32	40	48
BTS	91,27±1,5 ^a	84,53±1,9 ^a	77,28±4,8 ^a	73,16±2,5 ^a	67,09±2,9 ^a	62,46±3,6 ^a	57,85±1,6 ^a
MIII	91,36±1,5 ^a	82,85±1,6 ^a	76,24±3,7 ^a	72,35±3,3 ^a	63,83±3,9 ^a	59,04±4,9 ^a	51,81±6,6 ^a
Sperm Life	91,16±1,4 ^a	82,66±2,0 ^a	72,73±7,8 ^a	64,75±2,7 ^b	55,22±6,8 ^b	46,96±5,0 ^b	37,58±5,5 ^b
P-value	0,98	0,24	0,44	0,00	0,00	0,00	0,00

Superskrip yang berbeda mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P< 0,05).

Hasil penelitian menunjukkan pengencer BTS dan MIII memiliki kemampuan untuk melindungi membran plasma dan tudung akrosom, walaupun tidak diketahui dengan pasti kandungan nutrisi dan senyawa lainnya yang terdapat di dalam pengencer MIII dan BTS. Tingginya TAU dan MPU sperma pada pengencer BTS dan MIII mungkin berkaitan dengan kandungan nutrisi dan senyawa pelindung yang terkandung di dalam kedua pengencer tersebut. Salah satu senyawa yang terkandung di dalam pengencer BTS adalah EDTA yang berfungsi melindungi membran sperma terhadap kerusakan akibat peningkatan kalsium intraseluler yang berlebihan (Chi *et al.*, 2008). Pengencer MIII di sisi lain, mengandung BSA dan glisin yang berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik yang sesuai dengan kebutuhan sperma serta melindungi membran sperma terhadap kejutan dingin yang terjadi selama preservasi (Zhang *et al.*, 2015).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat keutuhan membran plasma dan tudung akrosom berkorelasi positif dengan motilitas dan viabilitas sperma (Tabel 3). Hasil penelitian ini berbeda dengan temuan penelitian Ezzati *et al.* (2020) yang menyatakan bahwa terdapat hubungan antara tingkat keutuhan membran dengan motilitas sperma. Sperma banyak yang tidak motil walaupun memiliki membran yang utuh, sehingga tingkat keutuhan membran tidak menjamin motilitas sperma. Sperma-sperma yang tidak motil namun memiliki membran plasma yang utuh ketika dipaparkan larutan dithiothreitol 3 mM dapat menunjukkan pergerakan yang sangat aktif. Hal ini menunjukkan bahwa sperma-sperma yang tidak bergerak tidak selalu memiliki membran plasma yang rusak, dan sperma-sperma yang demikian dapat mengekspresikan motilitas pada kondisi lingkungan yang tepat.

Tabel 3. Viabilitas sperma babi landrace dalam pengencer *Beltsville Thawing Solution*, *Mulberry III* dan *Sperm Life* yang disuplementasi ekstrak etanol daun kelor

Perlakuan	Jam pengamatan						
	0	8	16	24	32	40	48
BTS	90,25±1,8 ^a	84,70±2,0 ^a	76,87±4,3 ^a	73,32±1,9 ^a	68,17±2,8 ^a	63,38±2,7 ^a	58,18±0,7 ^a
MIII	90,32±1,9 ^a	83,17±2,2 ^a	76,30±3,4 ^a	72,44±3,4 ^a	65,08±4,0 ^a	60,06±3,9 ^a	52,01±6,1 ^a
Sperm Life	90,31±1,9 ^a	81,97±2,2 ^a	71,23±6,8 ^a	65,01±3,1 ^b	56,66±6,0 ^b	47,41±5,0 ^b	38,78±5,6 ^b
P-value	1,00	0,17	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00

Superskrip yang berbeda mengikuti angka pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P< 0,05).

Sperma babi sangat rentan terhadap kejutan dingin ketika didinginkan di bawah suhu 15°C (Watson, 2000). Suhu ketika menurun, maka terjadi penurunan proporsi sperma yang mempertahankan integritas

membran normal, ultrastruktur dan komponen biokimia (Johnson *et al.*, 2000). Membran plasma sperma adalah bagian utama terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh kejutan dingin (Bailey *et al.*,

2008), dan kemungkinan besar stres membran ini terkait dengan fase perubahan pada lipid dan perubahan status fungsional membran (Watson, 2000). Perubahan fase paling besar diketahui terjadi pada suhu 5 hingga 15°C (Drobnis *et al.*, 1993), yang mana mungkin merupakan kisaran suhu sensitif terhadap kerusakan membran. Proses kriopreservasi dapat menginduksi pembentukan ROS pada sel hewan (Kim *et al.*, 2010), dan *cryoinjury* mungkin diinduksi oleh aktivitas ROS yang dihasilkan selama pemrosesan sperma (Bailey *et al.*, 2008). Khususnya, sperma babi sensitif terhadap kerusakan peroksidatif karena kandungan asam lemak tak jenuh ganda yang tinggi (Cerolini *et al.*, 2000).

SIMPULAN

Penambahan ekstrak etanol daun kelor pada level 4% dalam pengencer BTS dan MIII menghasilkan kualitas sperma babi *landrace* yang lebih baik daripada pengencer *Sperm Life*.

SARAN

Untuk preservasi sperma babi sebaiknya menggunakan pengencer BTS dan MIII yang ditambahkan dengan ekstrak etanol daun kelor 4%.

DAFTAR PUSTAKA

Anel L, Gomes-Alves S, Alvarez M, Borrigan S, Anel E, Nicolas M, Martinez-Pastor F, de Paz P. 2010. Effect of basic factors of extender composition on post-thawing quality of brown bear electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 74(4): 643-651. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.004>

Arifiantini RI. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. Bogor. IPB Press.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Breque C, Dobrinski I, Zeng W, Galantino-Homer HL. 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70(8): 1251-1259. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.014>

Boonsorn T, Kongbuntad W, Narkkong N, Aengwanich W. 2010. Effects of catechin addition to extender on sperm quality and lipid peroxidation in boar semen. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 7(3):283-288. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103162545>

Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R. 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci* 58(1-2):99-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00035-4)

Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P. 2009. Effects of DHA-enriched hen egg yolk and Lcysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asia J Androl* 11(5):600-608. <https://doi.org/10.1038%2Faja.2009.40>

Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, Lee JY, Park JS, Chung DY, Choi SY, Kim MH, Chun EK, Roh SI. 2008. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 23(5): 1023-1028. <https://doi.org/10.1093/humrep/den060>

Dahril, Mauny MP, Munandar RH. 2021. Pengaruh daun kelor dan dislipidemia terhadap kuantitas sperma. *Journal of Medical Science* 2(2): 102-111. <https://doi.org/10.55572/jms.v2i2.44>

Das AK, Rajkumar V, Verma AK, Swarup D. 2012. *Moringa oleifera* leaves extract: a natural antioxidant for

- retarding lipid peroxidation in cooked goat meat patties. *International Journal of Food Science and Technology* 47:585-591. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02881.x>
- Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 265(4): 432-437. <https://doi.org/10.1002/jez.1402650413>
- Dube CM, Beaulieu C, Reyes-Moreno C, Guillemette, Bailey JL. 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62(5):874-886. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.006>
- Ezzati M, Shanebandi D, Hamdi K, Rahbar S, Pashaiasl M. 2020. Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell Tissue Bank* 21: 1-15.
- Foeh NDFK, Arifiantini RI, Yusuf TL. 2017. The quality of boar frozen semen diluted in BTS and MII[®] with different cryoprotectant supplemented with sodium dodecyl sulphate. *J Kedokteran Hewan* 11(1): 6-10. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v11i1.5809>
- Gopalakrishnan L, Doriya K, Kumar DS. 2016. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. *Food Sci Hum Wellness* 5:49-56. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.001>
- Guthrie HD, Welch GR. 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology* 63(2):396-410. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.020>
- Harrison RAP, Ashworth PJC, Miller NGA. 1996. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 45(3): 378-391. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199611\)45:3%3C378::AID-MRD16%3E3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3%3C378::AID-MRD16%3E3.0.CO;2-V)
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *J Anim Sci* 62(1-2): 143-172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Kasolo JN, Bimeya GS, Ojok L, Ochieng J, Okwal-okeng JW. 2010. Phytochemicals and uses of *Moringa oleifera* leaves in Uganda Rural Communities. *Journal of Medical Plant Research* 4(9): 753-757. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.492>
- Kumala IN, Masfufatun, Devi DRE. 2016. Potensi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai hepatoprotektor pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi parasetamol dosis toksis. *Jurnal Ilmiah Kedokteran* 5: 58-66. <http://erepository.uwks.ac.id/id/eprint/5502>
- Mapeka MH, Lehloenya KC, Nedambale TL. 2012. Comparison of different extenders and storage temperature on the sperm motility characteristics of Kolbroek pig semen. *South African Journal of Animal Science* 42(5): 530-534. <https://doi.org/10.4314/sajas.v42i5.18>
- Marlize S, Hine TM, Nalley WM. 2021. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku babi landrace dalam pengencer durasperm termodifikasi. *Jurnal Nukleus Peternakan* 8(2):150-160. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v8i2.4867>
- Mega M, Nalley WM, Marawali A, Belli H. 2022. Pengaruh perbedaan waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen

- beku babi landrace dalam pengencer durasperm modifikasi dengan air buah lontar. *Jurnal Nukleus Peternakan* 9(1):57-65.
<https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.4988>
- Moichela FT, Adefolaju GA, Henkel RR, Opuwari CS. 2020. Aqueous leaf extract of *Moringa oleifera* reduced intracellular ROS production, DNA fragmentation and acrosome reaction in Human spermatozoa *in vitro*. *Andrologia*53(1):e13903.
<https://doi.org/10.1111/and.13903>
- Orok EE, Essien A, Akpet SO, Ibom LA, Etop SC. 2010. Mean sperm concentration and percent motility of extended porcine semen as affected by antibiotics from selected sources and storage time. *International Journal of Current Research* 10: 1-6.
<https://journalcra.com/sites/default/files/issue-pdf/182.pdf>
- Paulenz H, Kommissrud E, Hofmo PO. 2001. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reproduction in Domestic Animals* 35(2): 83-87.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2000.00207.x>
- Rienprayoon C, Klangnak C, Onton S, Tretipskul C, Tummaruk P. 2012. A comparative study on the efficacy of four commercial semen extenders used during the holding time on the qualities of frozen-thawed boar semen. *Thai J Vet Med* 42: 195-200.
<https://doi.org/10.56808/2985-1130.2382>
- Rigau T, Farré M, Ballester J, Mogas T, Peña A, Rodríguez-Gil JE. 2001. Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology* 56(5):801-815.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00609-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00609-4)
- Schulze M, Henning H, Rüdiger K, Wallner U, Waberski D. 2013. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology* 80(9): 990-998.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.026>
- Shokry DM, Badr MR, Orabi SH, Khalifa HK, El-Seedi HR, Eldaim MAA. 2020. *Moringa oleifera* leaves extract enhances fresh and cryopreserved semen characters of Barki rams. *Theriogenology* 153: 133-142.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.007>
- Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Soom AV. 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Dom Anim* 39: 8-12. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00468.x>
- Watson P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G (Editor). *Marshall's physiology of reproduction*. Edinburgh. Churchill Livingstone Hlm. 747-869.
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60-61: 481-492.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00099-3)
- Williams AC, Christopher W, Ford L. 2013. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 22(4):680-695.
<https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02229.x>
- Zhang X-G, Yan G-J, Hong J-Y, Su Z-Z, Yang G-S, Li Q-W, Hu J-H. 2015. Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C.