

Penambahan *Astaxanthin* pada Pengencer Kuning Telur Berbagai Jenis Unggas Dapat Memproteksi Semen Babi Selama Penyimpanan

(*THE ADDITION OF ASTAXANTHIN ON SPERM DILUENTS PHOSPHATE EGG YOLK OF VARIOUS POULTRY CAN PROTECT QUALITY OF PIG SPERM DURING STORAGE*)

Wayan Bebas¹, Wayan Gorda¹

¹Lab Reproduksi Veteriner. ²Lab Bedah dan Radiologi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jln Sudirman Denpasar, Denpasar, Bali, Indonesia
Tlp. (0361) 223791. Fax. (0361) 223791
E-mail: wayanbebas@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan formula pengencer semen babi yang baik dalam kualitas, murah dan mudah dibuat dengan menggunakan kuning telur dari berbagai unggas seperti ayam, bebek dan burung puyuh dengan penambahan astaxanthin sebagai antioksidan berkekuatan tinggi. Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap pola faktorial dengan tiga macam pengencer sperma dan empat tingkat konsentrasi *astaxanthin* sebagai faktor. Pengencer sperma yang digunakan adalah kuning telur bebek fosfat, kuning telur puyuh fosfat dan kuning telur ayam fosfat sedangkan konsentrasi *astaxanthin* yang telah ditambahkan pada masing masing pengencer dengan penambahan *astaxanthin* disimpan pada suhu 5°C selama 48 jam. Setelah penyimpanan dilakukan evaluasi terhadap kualitas sperma yang meliputi motilitas progresif, abnormalitas spermatozoa, daya hidup, dan membran plasma utuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer spermatozoa menggunakan fosfat kuning telur bebek dengan penambahan 0,002% *astaxanthin* memberikan motilitas progresif, daya hidup dan membran plasma utuh yang paling tinggi sedangkan abnormalitas spermatozoa yang paling rendah. Dapat disimpulkan bahwa pengencer spermatozoa fosfat kuning telur bebek dengan penambahan 0,002% *astaxanthin* mampu mempertahankan kualitas semen babi yang disimpan pada suhu 5°C selama 48 jam.

Kata-kata kunci: pengencer sperm; kuning telur berbagai unggas; astaxanthin; kualitas semen babi.

ABSTRACT

A study was conducted to formulate semen diluent of pig with a better quality, cheap and easy to prepare using egg yolk of various poultries such as chickens, ducks and quails in combination with astaxanthin, a potent antioxidant. The research design used was a completely randomized factorial design with three different types of sperm diluents and four levels of astaxanthin concentration. Sperm diluents used were phosphate duck egg yolk, phosphate quail egg yolk and yolks phosphate supplemented respectively with 0,002%, 0,004% and 0,008% astaxanthine. The treated sperm were stored at 5°C for 48 hours. The sperm qualities were examined for progressive motility, spermatozoa abnormalities, viability and plasma membrane integrity. The result showed that sperm diluents of using duck egg yolk phosphate in combination with 0.002% astaxanthin resulted in the highest progressive motility, viability and plasma membrane intact while abnormalities spermatozoa is lowest. It can be concluded that phosphate duck egg yolk sperm diluents with the addition of 0,002% astaxanthin appeared to be able to maintain the quality of pig sperm stored at 5°C for 48 hours.

Keywords: sperm diluents; egg yolk of various poultry; astaxanthin; pig semen quality

PENDAHULUAN

Dalam penerapan teknologi kawin suntik/inseminasi buatan salah satu hal yang penting adalah bagaimana mempertahankan kualitas semen harus tetap baik dalam kurun waktu tertentu sehingga penggunaan semen menjadi efisien dan menghasilkan angka kebuntingan yang tinggi dengan jumlah anak sekelahiran (*litter size*) yang banyak.

Saat ini inseminator di pedesaan dalam upaya pelayanan kawin suntik pada babi masih menggunakan semen segar yaitu semen ditampung dari pejantan unggul kemudian di kemas dalam botol langsung dibawa kelapangan untuk pelayanan inseminasi buatan. Penggunaan semen segar tanpa melalui proses pengenceran mempunyai banyak kelemahan. Semen segar cepat sekali mengalami penurunan kualitas seperti: penurunan motilitas dan daya hidup disebabkan karena plasma semen segar babi mengandung protein yang berpengaruh buruk terhadap membran plasma sel spermatozoa karena bereaksi dengan lipid penyusun membran plasma sel, dan kecepatan daya rusaknya sangat tergantung dari konsentrasi protein plasma tersebut (The'rien *et al.*, 1998; The'rien *et al.*, 1999). Paparan terus menerus protein plasma semen dengan spermatozoa dapat merusak membran plasma spermatozoa (Manjunath dan The'rien, 2002), menghambat motilitas (Iwamoto dan Gagnon, 1988), berpengaruh negatif terhadap kelangsungan hidup sperma (Way *et al.*, 2000).

Selama proses penampungan semen, pengenceran, penyimpanan dingin, pembekuan, dan pencairan kembali semen beku akan menghasilkan *reactive oxygen species*/ROS (Bilodeau *et al.*, 2001). Senyawa ROS mengakibatkan peroksidasi lipid yang dapat memicu hilangnya integritas membran, menyebabkan peningkatan permeabilitas sel, inaktivasi enzim, kerusakan struktur DNA, dan kematian sel (Hsieh *et al.*, 2006; Bebas *et al.*, 2016).

Untuk mengatasi permasalahan tersebut maka terhadap semen segar perlu dilakukan upaya pengenceran dengan menggunakan bahan pengencer. Salah satu bahan dasar pengencer yang mempunyai potensi untuk digunakan adalah kuning telur, karena kandungan fraksi *low-density lipoprotein*/LDL (Moussa *et al.*, 2002). Senyawa LDL dapat berinteraksi secara spesifik dengan protein plasma semen dan kapasitas pengikatannya

sangat tinggi (Manjunath dan The'rien, 2002). Kuning telur dapat mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa akibat protein plasma semen dan sangat menguntungkan selama penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin (Bergeron *et al.*, 2004). Kuning telur dapat membantu spermatozoa untuk menahan kejutan dingin/*coldshock* (Amirat *et al.*, 2004), menstabilkan membran akrosom, sebagai *buffer*, menjaga tekanan osmosis, mencegah kerusakan sel secara mekanik, mengandung faktor pertumbuhan, mengandung vitamin yang larut dan tak larut air (Yang *et al.*, 2012).

Sumber kuning telur yang berlimpah bisa dari berbagai jenis unggas seperti burung puyuh, ayam ras petelur, ayam kampung, bebek dan entok yang sangat menarik untuk diteliti sebagai bahan dasar pengencer semen babi. Kuning telur dari berbagai jenis unggas tersebut mengandung komponen dasar yang hampir sama, tetapi kandungan asam lemak dan fosfolipidnya yang berbeda, Kuning telur bebek mengandung lebih banyak *monounsaturated fatty acids* (MUPA) dibandingkan kuning telur ayam, dan burung puyuh. Kuning telur bebek mengandung lebih banyak *phosphotidylinositol* (PI) dibandingkan ayam dan puyuh (Bathgate *et al.*, 2006),

Selama proses penyimpanan pada suhu dingin di samping mengalami kejutan dingin, spermatozoa juga mengalami stres oksidatif atau terjadi serangan ROS, untuk itu dalam pengencer perlu ditambahkan antioksidan. *Astaxanthin* merupakan antioksidan paling kuat saat ini (Capelli dan Cysewski, 2007). Menurut Bagchi (2001) *astaxanthin* mempunyai kekuatan menangkal radikal bebas 65 kali lebih kuat dari Vitamin C, 14 kali lebih kuat dari Vitamin E, dan 54 kali lebih kuat dari β -karoten. Tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk menghasilkan formula pengencer semen babi yang baik dalam kualitas, murah dan mudah dibuat dengan menggunakan kuning telur dari berbagai unggas seperti ayam, bebek dan burung puyuh dengan penambahan *astaxanthin* sebagai antioksidan berkekuatan tinggi.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan satu ekor babi Landrace jantan, umur 2 tahun. Penampungan semen dilakukan dengan metoda pemijatan dengan tangan bersarung, lalu semen ditampung menggunakan botol yang dilapisi

dengan kain kasa steril untuk menyaring gel dari semen (Hu *et al.*, 2006). Semen yang ditampung hanya praksi kedua yaitu praksi yang kaya akan sperma, sedangkan praksi pertama dan praksi ketiga yang berwarna bening tidak ditampung. Semen hasil penampungan ditaruh pada *water bath* suhu 37°C untuk dilakukan evaluasi baik secara makroskopis (volume, pH, konsistensi/kekentalan, bau, dan warna), dan mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi spermatozoa, dan abnormalitas). Pengencer yang digunakan pada penelitian ini adalah pengencer fosfat kuning telur ayam kampung, kuning telur bebek, dan kuning telur puyuh. Kuning telur yang ditambahkan pada buffer fosfat sebanyak 20%*v* (Chanapiwat *et al.*, 2012). Ditambahkan antibiotik penisilin dan streptomisin masing masing masing 1000 IU dan 1000 µg dalam setiap 1 ml pengencer. Pada setiap pengencer ditambahkan astaxanthin dengan konsentrasi yang berbeda beda: 0%, 0,002%, 0,004%, 0,008%. Dilakukan pengenceran semen dengan masing masing pengencer dengan konsentrasi spermatozoa 5×10^9 sel/80mL (satu dosis inseminasi). Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 15°C selama 48 jam. Selama penyimpanan setiap 12 jam dilakukan penghomogenan semen dengan menggoyangkan secara perlahan bertujuan agar komponen pengencer dan spermatozoa tidak mengendap. Setelah waktu penyimpanan dilakukan pemeriksaan terhadap MP, DH, AS, dan MPU.

Pemeriksaan Motilitas Progresif (MP)

Teteskan semen 0,05 ml di atas obyek gelas hangat (37°C) lalu ditutup dengan cover gelas, amati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Dilakukan penghitungan spermatozoa yang mempunyai pergerakan yang progresif dihitung dalam satuan persen, pengamatan dilakukan terhadap lima lapang pandang (Breininger *et al.*, 2004).

Penghitungan Daya Hidup (DH)

Pemeriksaan daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pengecatan eosin-negrosin menurut Kvist dan Bjo̅rndahl (2002). Eosin-negrosin dibuat dengan mencampurkan 6,7 g/L Eosin Y dan 9 g/L Nigrosin dalam 9 g/L sodium chloride. Campurkan 50 µL semen dengan 50 µL eosin-nigrosin lalu homogenkan. Setelah 30

detik dibuat preparat ulas lalu keringkan dengan cara dianginkan, diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 450x sebanyak 200 sel spermatozoa. Sel spermatozoa yang mati akan terlihat berwarna merah, sedangkan yang masih hidup tidak terwarnai/transparan. Hitung spermatozoa yang hidup dalam satuan persen.

Pemeriksaan Abnormalitas Spermatozoa (AS)

Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan teknik yang sama dengan pemeriksaan daya hidup spermatozoa dengan pengecatan eosin-negrosin menurut Kvist dan Bjo̅rndahl (2002) diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 450x sebanyak 200 sel spermatozoa. Sel spermatozoa yang mengalami bentuk abnormal baik di daerah kepala, badan dan ekor dihitung dalam satuan prosen.

Pemeriksaan Membran Plasma Utuh (MPU)

Persentase MPU spermatozoa dievaluasi dengan metode *Hypoosmotic swelling (HOS) test* (Zamfirescu, 2001). Komposisi larutan hipoosmotik terdiri atas: 0,9g fruktosa + 0,49g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml (100 mOsm/Kg). Sebanyak 20 ml larutan hipoosmotik ditambahkan dengan 0,2ml semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian evaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x terhadap 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji Ducan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semen segar babi *Landrace* yang telah ditampung dengan metode pemijatan dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Hasil evaluasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segar babi Landrace

Kualitas semen segar babi Landrace	
Pemeriksaan makroskopis	
Kekentalan semen	Encer
Warna semen	Putih krem
Volume (mL)	170 mL
Keasaman /Ph	7,0
Bau	Khas semen babi
Pemeriksaan mikroskopis	
Greakan massa	++
Konsentrasi (10^6 /mL)	800
Spermatozoa bergerak progresif (%)	89 P
Spermatozoa hidup (%)	92
Spermatozoa Abnormalitas (%)	7,0

Keterangan: ++ = Gerakan gelombang massa baik.

P = Gerakan individu spermatozoa maju dan cepat.

Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis menunjukkan semen babi tersebut mempunyai kualitas yang baik dan layak untuk digunakan. Pemeriksaan kekentalan, warna, pH, bau, abnormalitas spermatozoa hasilnya tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Tamoës *et al.* (2014) dan Parasara *et al.* (2015). Namun, volume, konsentrasi, dan spermatozoa yang bergerak progresif memberikan hasil yang berbeda. Volume semen yang ditampung sebanyak 170 mL, lebih rendah dari hasil penelitian Tamoës *et al.*, 2014 dan Parasara *et al.*, 2015, masing masing: 218,4±68,7 ml; dan 212,00±10,95 ml. Konsentrasi dan spermatozoa yang bergerak progresif pada penelitian ini masing masing: 800x10⁶ sel/mL dan 89%, Tamoës *et al.*, 2014 melaporkan 238,00±4,49 x 10⁶ sel/mL dan 78,00±2,74%, sedangkan Parasara *et al.*, 2015, melaporkan 261,0±56,80 x 10⁶ sel/mL dan 64,8±2,16%. Hal ini disebabkan karena pada penelitian ini semen yang ditampung hanya fraksi kedua (fraksi kaya spermatozoa) dengan tanpa menampung fraksi pertama dan ketiga sehingga volume semen yang didapat lebih sedikit tetapi mempunyai konsentrasi dan motilitas progresif yang jauh lebih tinggi. Plasma semen babi berdampak kurang baik terhadap kualitas semen karena mengandung protein yang mampu merusak lipid penyusun membran plasma sel, dan daya rusaknya sangat tergantung pada konsentrasi protein plasma

tersebut (The'rien *et al.*, 1998; The'rien *et al.*, 1999). Semen dengan kualitas tersebut mampu melayani babi sebanyak 24 ekor dengan menggunakan konsentrasi 5x10⁹ sel/80 mL pengencer per dosis inseminasi.

Hasil pengamatan motilitas progresif/MP, abnormal spermatozoa/AS, daya hidup/DH, dan membran plasma utuh/MPU pada semen babi yang diencerkan dengan pengencer fosfat kuning telur bebek, puyuh, dan ayam kampung dengan penambahan berbagai konsentrasi astaxanthin (0,000%, 0,002%, 0,004%, dan 0,008% yang disimpan pada suhu 15°C selama 48 jam, disajikan pada Tabel 2.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer fosfat kuning telur bebek memberikan hasil yang nyata lebih baik (P<0,05) terhadap motilitas progresif/MP, abnormal spermatozoa/AS, daya hidup/DH, dan membran plasma utuh/MPU jika dibandingkan dengan pengencer fosfat kuning telur puyuh dan ayam kampung. Pengencer fosfat kuning telur puyuh memberikan hasil yang nyata lebih baik (P<0,05) jika dibandingkan dengan pengencer fosfat kuning telur ayam kampung. Penambahan antioksidan *astaxanthin* dengan konsentrasi 0,002% memberikan hasil yang paling baik terhadap MP, AS, DH dan MPU jika dibandingkan dengan konsentrasi 0,000%, 0,004% dan 0,008%.

Menurut Santoso (2011), kalau dibandingkan nilai gizi per 100 gram antara telur bebek, burung puyuh, dan ayam ternyata telur bebek mempunyai nilai gizi yang lebih baik. sedangkan telur burung puyuh lebih baik jika dibandingkan dengan telur ayam. Telur bebek mempunyai kandungan lemak dan kolesterol yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan telur burung puyuh dan telur ayam, dan telur burung puyuh kandungan kolesterol dan lemaknya lebih tinggi dari telur ayam. Telur bebek sangat kaya akan kalsium, besi, magnesium, fosfor, sodium, seng, *copper*, selenium, kaya akan folat. Kadar kolesterol telur bebek dan burung puyuh kira-kira hamper dua kali lipat jika dibanding dengan telur ayam.

Kuning telur adalah salah satu bahan dasar pengencer yang mempunyai kandungan fraksi LDL yang tinggi (Moussa *et al.*, 2002). Senyawa LDL dapat berinteraksi secara spesifik dengan protein plasma semen babi yang bersifat merusak dan kapasitas pengikatannya sangat tinggi (Manjunath, 2002). Kuning telur dapat mencegah kerusakan membran plasma

Tabel 2. Kualitas semen babi yang diencerkan dengan pengencer fosfat kuning telur bebek, burung puyuh dan ayam kampung dengan penambahan berbagai konsentrasi *astaxanthin* yang disimpan pada suhu 15°C selama 48 jam

Pengencer	Asta xanthin	Motilitas progresif	Abnormal spermatozoa	Daya hidup	Membran plasma utuh	Nilai P
Telur Bebek	0,000%	72,25±1,708	5,25±0,957	82,25±2,062	79,50±2,887	A
	0,002%	79,25±2,500	4,25±0,500	89,75±1,708	89,00±5,657	B
	0,004%	71,75±2,062	5,50±0,577	81,50±3,000	77,25±2,630	A
	0,008%	62,25±1,708	6,50±0,577	76,25±2,630	72,50±1,291	C
		A	A	A	A	
Telur Puyuh	0,000%	62,00±1,826	7,75±0,957	76,50±3,109	74,00±3,367	A
	0,002%	66,75±2,217	5,25±0,957	82,00±1,826	79,25±0,957	B
	0,004%	63,75±0,957	6,50±0,577	77,25±2,217	75,25±1,258	A
	0,008%	61,00±0,816	8,50±0,577	74,50±1,291	71,25±1,500	C
		B	B	B	B	
Telur Ayam Kampung	0,000%	5,875±2,217	9,25±0,957	73,25±1,258	71,00±2,449	A
	0,002%	62,75±2,217	7,00±0,816	76,75±1,893	74,50±0,577	B
	0,004%	60,25±1,893	7,25±0,957	73,50±0,577	71,00±1,155	A
	0,008%	57,00±1,826	10,50±1,291	71,25±0,957	66,50±1,291	C
		C	C	C	C	

Keterangan : Data yang ditampilkan merupakan rata-rata + standar deviasi. Huruf yang sama pada baris yang sama atau kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata $P < 0,05$.

spermatozoa akibat pengerusakan oleh protein plasma semen dan sangat menguntungkan selama penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin (Bergeron *et al.*, 2004). Kuning telur dapat membantu sperma untuk menahan *coldshock* (Amirat *et al.*, 2004).

Kandungan kolesterol pada kuning telur adalah agen yang paling efektif untuk melindungi spermatozoa terhadap *cold shock*, dapat melindungi spermatozoa saat terjadi perubahan suhu dari suhu tubuh ke suhu ruang (28°C) dan kemudian penyimpanan pada suhu dingin (15°C) (Aboagla dan Terada, 2004). Khasiat utama kuning telur adalah kandungan lesitin (*phosphatidil cholin*) yang dapat bersifat membran *couiting* untuk tetap mempertahankan konfigurasi normal *phospholipid bilayer* yang merupakan susunan utama membran sel spermatozoa (Moussa *et al.*, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan kualitas semen babi (MP, AS, DH, dan MPU) yang diencerkan dengan fosfat kuning telur bebek, burung puyuh, dan ayam kampung yang disimpan pada suhu 15°C selama 48 jam hasilnya sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Clulow *et al.* (2004) yang melakukan penyimpanan semen kuda dengan kuning telur bebek menghasilkan motilitas progresif lebih

baik dibandingkan kuning telur ayam. Andrabi *et al.* (2008) menggunakan telur bebek sebagai bahan dasar pengencer dapat meningkatkan kualitas semen beku kerbau. Trimeche *et al.* (1997) menyatakan kuning telur puyuh memberikan perlindungan lebih baik dari kuning telur ayam untuk mengencerkan semen *poitou jackass*.

Astaxanthin adalah antioksidan yang digolongkan kedalam kelas karotenoid yakni *xantopil* (Liu dan Osawa, 2007). *Astaxanthin* mempunyai struktur molekul yang sangat istimewa dengan kehadiran oksigen sebagai gugus hidroksil (OH), dan gugus karbonil (C=O) atau kombinasi keduanya. Kehadiran gugus fungsional hidroksil dan karbonil dalam ketokarotenoid (rantai poliена), membuat *astaxanthin* sebagai antioksidan yang berkekuatan tinggi (Liu dan Osawa, 2007; Hussein *et al.*, 2006a). Keberadaan gugus hidroksil dan keton pada setiap cincin ionnya menyebabkan kemampuan esterifikasi dan aktivitas antioksidannya lebih tinggi dan lebih bersifat polar dibandingkan antioksidan lainnya. *Astaxanthin* dalam menanggulangi radikal bebas dengan cara *scavenge* O_2^- (bereaksi langsung dengan radikal peroksil) (Hussein *et al.*, 2006). *Astaxanthin* dapat melindungi secara

esensial fungsi biologis termasuk melindungi dan melawan peroksidasi membran-lipid seperti PUFA, protein, kerusakan DNA, pengaruh sinar *ultra violet*, dan berperan penting dalam respons imun (Yuan *et al.*, 2011) dan mampu melindungi kerusakan membran mitokondria sel dari serangan radikal bebas (Wolf *et al.*, 2009).

Penambahan *astaxanthin* konsentrasi 0,002% pada pengencer fosfat kuning telur bebek, burung puyuh dan ayam kampung menghasilkan MP, DH, dan MPU paling baik dengan AS yang paling rendah. Peningkatan konsentrasi *astaxanthin* menjadi 0,004%, dan 0,008% memberikan hasil kualitas spermatozoa yang semakin menurun. Hal ini disebabkan karena pemakaian antioksidan yang berlebih malah justru akan menjadi pro-oksidan. Beberapa peneliti pernah melaporkan penambahan *astaxanthin* pada pengencer sebagai antioksidan untuk mempertahankan kualitas semen ayam kampung (Indrawati *et al.* 2013 ; Octa *et al.*, 2014), pada semen ayam hutan hijau (Bebas *et al.*, 2016).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pengencer fosfat kuning telur bebek dengan penambahan *astaxanthin* 0,002% mampu mempertahankan kualitas semen babi paling baik selama penyimpanan pada suhu 5°C selama 48 jam.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui daya fertilitas dan *litter size* yang dihasilkan, terhadap babi yang diinseminasi menggunakan semen yang diencerkan dengan fosfat kuning telur bebek dengan penambahan *astaxanthin* 0,002%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada Bapak Rektor melalui Ketua LPPM Unud yang telah memberikan dukungan dana melalui Hibah Unggulan Program Studi dengan nomor kontrak: 391-8/UN14.2/PNL.01.03.00/2015

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing experiment of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 1160-1172.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61: 895-907
- Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 104: 427-433.
- Bagchi D. 2001. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C, E, B-carotene, pycnogenol, grape seed proanthocyanidin extract, astaxanthin and bioastin in vitro. On File At Cyanotech Corporation.
- Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41(1): 68-73.
- Bebas W, TGO Pemayun TGO, Damriyasa IM, Mantik-Astawa IN. 2016. Lactose-astaxanthin increases green jungle fowl's sperm motility and reduces sperm DNA fragmentation during 5°C storage. *Bali Med J* 4(3): 152-156
- Bergeron A, Crête MH, Brindle Y, Manjunath P. 2004. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 70: 708-717.
- Bilodeau JF, Blanchette S, Gagnon IC, Sirard MA. 2001. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56: 275-286
- Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM. 2004. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63 : 2126-2135.

- Capelli, Cysewski (2007). *Astaxanthin (natural astaxanthin king of the carotenoids)*. North Miami Beach. Florida. Cyanotech.
- Chanapiwat P, Kaeoket K, Tummaruk P. 2012. Cryopreservation of boar semen by egg yolk-based extenders containing lactosa or fructose is better than sorbitol. *J Vet Med Sci* 74(3): 351-354.
- Clulow J, Maxwell WMC, Evans G, Morris LHA. 2004. A comparison between duck and chicken egg yolk for the cryopreservation of stallion spermatozoa. Proc 15th Int Cong. Anim Reprod. Porto Seguro, Brazil. Hlm. 506 (Abstract).
- Octa D, Trilaksana IGNB, Bebas W. 2014. Glukosa-astaxanthin meningkatkan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada Suhu 3-5° C. *Indonesia Medicus Veterinus* 3(1): 9-19
- Hu J-H, Qing Li W, Li G, Chen XY, Yang H, Zhang SS, Wang LQ. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoprotein. *Asian-Aust J Anim Sci*. 19(4): 486-494.
- Hussein G, Goto H, Oda S, Sankawa U. 2006. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 29: 684-688.
- Hussein G, Sankawa U, Goto H, Matsumoto K, Watanabe H. 2006a. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. *J Nat Prod* 69(3): 443-449.
- Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. 2006. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci* 2: 23-29
- Indrawati D, Bebas W, Trilaksana IGNB. 2013. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung dengan penambahan astaxanthin pada suhu 3-5°C. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(4): 445 - 452
- Iwamoto T, Gagnon C. 1988. Puriûcation and characterization of a sperm motility inhibitor in human seminal plasma. *J Androl* 9: 377-383.
- Kvist U, Bjo`rndahl L. 2002. Editorial. Dalam: Kvist U, Bjo`rndahl L, eds. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford, United Kingdom. Oxford University Press.
- Liu X, Osawa T. 2007. *Cis* astaxanthin and especially 9-*cis* astaxanthin exhibits a higher antioxidant activity in vitro compared to the all-*trans* Isomer. *Biochem Biophys Res Commun* 357(1): 187-193.
- Manjunath P, The`rien I. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modiûcation that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53: 109-119.
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Oriza. 2013. Astaxanthin. Natural Antioxidant for Neuro-protection, Vision, Enhancement & Skin Rejuvenation. Oryza Oil & FAT Chemical Co.LTD. www.oryza.co.jp/html/english/pdf/Astaxanthin %20ver%202.1.pdf. Tanggal akses 12/6/2013.
- Parasaara IGNAM, Sumardani NLG, Suranjaya IG. 2015. Korelasi ukuran testes terhadap produksi dan kualitas semen cair babi landrace dalam rangkaian inseminasi buatan. *Peternakan Tropika* 3(1): 93-104.
- Santoso U. 2011. Telur itik, telur puyuh dan telur ayam, mana yang lebih baik. *Livestock, Bengkulu, Indonesia*, Tuesday, October 18, 2011. <http://livestock-livestock.blogspot.com/2011/10/telur-itik-telur-puyuh-dan-telur-ayam.html>
- Tamoes JA, Nalley WN, Hine TM. 2014. Fertilitas spermatozoa babi Landrace dalam pengencer modifikasi zorlesco dengan susu kacang kedelai. *Sains Peternakan* 12(1): 20-30.
- The`rien I, Moreau R, Manjunath P. 1988. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein Induce cholesterol efûux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 59: 768-776.

- The'rien I, Moreau R, Manjunath P. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod* 61: 590-598.
- Trimecha A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D, 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectants for the freeze preservation of poitou jackass sperm. *Cryobiology* 34: 385-393.
- Way AL, Griel LC Jr, Killian GJ. 2000. Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 21(2): 13-219.
- Wolf AM, Asoh S, Hiranuma H, Ohsawa I, Iio K, Satou A, Ishikura M, Ohta S. 2001. Molecular characteristics of astaxanthin and beta-carotene in the phospholipid monolayer and their distributions in the phospholipid bilayer. *Chem Phys Lipids* 113(1-2) : 11-22.
- Yang R, Jing Li J, Peng X, Song X-q, Yang J-l. 2012. Effect of egg yolk added to goose semen extender on the semen survival time. *Journal of Food Agriculture & Environment* 10(2): 491-492.
- Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH. 2011. Review. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res* 55: 150-165.