

PENGARUH PENAMBAHAN FILTRAT ROSELLA (*Hibiscus sabdariffa* Linn) KE DALAM PENGECER TRIS-KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA KAMBING KACANG

*(THE EFFECT OF ROSELLA FILTRATE (*Hibiscus sabdariffa* Linn) SUPPLEMENTATION IN TRIS-
EGG YOLK EXTENDER ON SPERMATOZOA QUALITY OF KACANG GOAT)*

Reynold Laos^{*}, Aloysius Marawali, Petrus Kune, Henderiana L. L. Belli, Kirenus Uly
Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana, Jln. Adisucipto Penfui, Kupang 850001
^{*}Correspondent author, email: reynoldlaos@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai level filtrat rosella (FR) ke dalam pengencer tris-kuning telur (T-KT) terhadap kualitas spermatozoa kambing kacang. Semen ditampung dua kali seminggu menggunakan metode vagina buatan dari tiga ekor kambing pejantan. Semen segar yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis dengan nilai motilitas 80%, viabilitas 86,58%, konsentrasi 2.099,40 jutasel spermatozoa/ml, dan abnormalitas 2,83%. Kemudian semen segar tersebut diencerkan sesuai dengan perlakuan yaitu P0 (T-KT 100%), P1 (T-KT 100% + FR 1%), P2 (T-KT 100% + FR 2%), P3 (T-KT 100% + FR 3%), P4 (T-KT 100% + FR 4%), P5 (T-KT 100% + FR 5%). Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 3-5°C, dan evaluasi dilakukan setiap 24 jam terhadap kualitas spermatozoa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa dalam pengencer T-KT dengan penambahan FR 3% (P3) mempunyai kualitas yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan ke lima perlakuan lainnya, yaitu dengan motilitas mencapai (42,99±2,19%), viabilitas (49,30±2,24%), dan abnormalitas (4,012±0,49%) selama 5 hari penyimpanan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah penambahan filtrat rosella 3% dalam pengencer tris-kuning telur merupakan level terbaik dan lebih efektif dalam mempertahankan kualitas spermatozoa kambing kacang.

Kata-kata kunci: Tris, kuning telur, filtrat rosella, spermatozoa, kambing kacang

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of adding various levels of roselle filtrate (RF) into tris-egg yolk diluents (T-EY) on the quality of kacang goat spermatozoa. Semen was collected twice a week using an artificial vagina method of three male goats. Fresh semen obtained was evaluated macroscopically and microscopically with a motility value of 80%, viability 86.58%, concentration of 2,099.40 millionspermatozoa cells/ml, and an abnormality of 2.83%. Then the fresh semen was diluted according to the treatment, namely T0 (T-EY 100%), T1 (T-EY 100% + RF 1%), T2 (T-EY 100% + RF 2%), T3 (T-EY 100% + RF 3%), T4 (T-EY 100% + RF 4%), T5 (T-EY 100% + RF 5%). The diluted semen was stored at 3-5°C, and evaluation was carried out every 24 hours on the quality of the spermatozoa. The results showed that spermatozoa in T-EY diluent with the addition of 3% RF (T3) had a higher quality ($T < 0.05$) compared to the other five treatments, namely the motility reached (42,99±2,19%), viability (49,30±2,24%), and abnormalities (4,012±0,49%) during 5 days of storage. The conclusion of this study is the addition of 3% roselle filtrate in tris-egg yolk diluent is the best level and is more effective in maintaining the quality of spermatozoa kacang goat.

Keywords: Tris, egg yolk, roselle filtrate, spermatozoa, kacang goat

PENDAHULUAN

Kambing kacang adalah salah satu bangsa kambing lokal yang tersebar luas diseluruh wilayah Indonesia dan memiliki keunggulan yaitu mampu beradaptasi dengan keadaan alam sekitar serta mempunyai daya reproduksi sangat tinggi pada lingkungan yang buruk. Namun pengembangan kambing kacang jika dibandingkan dengan sapi dan kerbau masih

tertinggal jauh, oleh sebab itu perlu dilakukan peningkatan mutu genetik kambing kacang melalui program inseminasi buatan (IB).

Dalam menunjang keberhasilan kegiatan IB maka perlu dilakukan pengenceran semen yang bertujuan untuk meningkatkan volume semen dan mempertahankan kualitas semen. Susilawati (2011), menyatakan bahwa bahan

pengencer yang digunakan harus tidak racun, bersifat isotonis, dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (cold shock), menghambat pertumbuhan mikroba, bersifat sebagai penyangga (buffer), dapat meningkatkan volume semen dan sebagai sumber nutrisi bagi spermatozoa. Tris aminomethane kuning telur adalah salah satu pengencer yang banyak digunakan dan mampu mempertahankan kualitas semen cair.

Situmorang (2002), menyatakan bahwa Tris aminomethane berfungsi sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah dalam konsistensi yang tinggi. Kuning telur berfungsi sebagai anti cold shock yang dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang ke suhu 5°C (Aboagla dan Terada, 2004). Untuk mempertahankan dan meningkatkan kualitas semen yang lebih baik, maka kedalam pengencer tris kuning telur perlu ditambahkan bahan pengencer lain yang didalamnya terdapat zat-zat yang dibutuhkan oleh spermatozoa seperti zat antioksidan yang berfungsi sebagai penangkal radikal bebas.

Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) merupakan salah satu tanaman yang berpotensi sebagai sumber antioksidan alami. Menurut Maryani dan Kristiana, (2005), bahwa dalam kelopak bunga rosella terdapat kandungan kalori 44 kal, air 86,2%, protein 1,6 g, lemak 0,1 g, karbohidrat 11,1 g, serat 2,5 g, abu 1 g, kalsium

486 g, fosfor 60 ml, besi 3,8 mg, β-karoten 285 g, vitamin C 214,68 mg, tiamin 0,04 mg, riboflavin 0,6 mg, niasin 0,5 mg.

Setyaningsih (2011), dalam penelitiannya tentang pengaruh pemberian infuse simplisia rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus* L.) jantan galur DDY. Dosis yang digunakan dihitung berdasarkan jumlah kelopak kering yang umum dikonsumsi masyarakat yaitu berjumlah 5 kelopak atau sekitar 3-4 g per hari, kemudian dikonversikan terhadap mencit sehingga diperoleh dosis 3%. Dosis tersebut diturunkan dan dinaikan sehingga dosis yang digunakan yaitu 1,5% (P1), 3% (P2), dan 6% (P3). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian infus simplisia rosella dapat meningkatkan motilitas spermatozoa dengan nilai rata-rata persentase spermatozoa motil pada setiap perlakuan yaitu 38,20% (P1), 43,00% (P2), dan 38,60% (P3) serta menurunkan abnormalitas pada semua kelompok perlakuan yaitu 30,40% (P1), 26,80% (P2), dan 37,60% (P3).

Dalam penelitian ini, spermatozoa kambing kacang dipreservasi dalam pengencer T-KT yang ditambahkan dengan berbagai konsentrasi filtrat rosella (FR). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan FR ke dalam pengencer T-KT terhadap kualitas spermatozoa kambing kacang.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Penelitian menggunakan semen segar yang diperoleh dari 3 ekor ternak kambing Kacang jantan yang berumur 3 tahun. Kambing jantan tersebut dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat makan dan minum. Pakan hijauan jenis legum yaitu lamtoro diberikan 2 kali sehari sebanyak 10% dari berat badan dan penambahan konsentrat sebanyak 0,5 kg/ekor/hari serta air minum.

Penyiapan Bahan Pengencer:

Tris aminomethane

Siapkan tris aminomethane, fruktosa, dan asam sitrat kemudian masing-masing bahan ditimbang sebanyak 3,634 g tris, 0,5 g fruktosa dan 1,99 g asam sitrat. Ke-3 bahan tersebut ditambahkan ke dalam 100 ml aquades pada gelas erlenmeyer, kemudian dihomogenkan.

Kuning telur

Mengambil telur ayam kemudian membersihkannya dengan kapas yang telah dibasahi dengan alkohol 70%. Pecahkan kulit telur dibagian lancipnya kemudian tuangkan semua putih telur dan pisahkan putih telur dengan kuning telur yang masih terbungkus oleh membran vitelin, kemudian menempatkan pada kertas saring lalu dimiringkan sambil diputar agar semua putih telur terserap habis. Kemudian pecahkan membran vitellin pada kuning telur, setelah itu masukan kuning telur kedalam gelas ukur. Kuning telur siap digunakan.

Filtrat rosella (FR)

Memilih kelopak rosella yang baik, bentuknya masih utuh dan warnanya merah. Kemudian dicuci sampai bersih, diiris tipis-tipis lalu dikeringkan menggunakan oven dengan

suhu 105°C selama 24 jam. Memasukan rosella kering ke dalam blender kemudian memblender sampai halus. Setelah dihaluskan, timbang 100 mg menggunakan timbangan elektrik kemudian dilarutkan dengan 15 ml aquabides lalu dicentrifuge dengan kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit, untuk mendapatkan filtratnya. Supernatan yang terpisah diambil dan merupakan FR yang siap digunakan.

Pengencer perlakuan

Pembuatan pengencer perlakuan menggunakan 80 mL pengencer Tris dan tambahkan 20 mL kuning telur, homogenkan hingga tercampur menggunakan stirer, selanjutnya tambahkan antibiotic dan FR sesuai perlakuan, yaitu: T-KT 100% + FR 0% (P0), T-KT 100% + FR 1% (P1), T-KT 100% + FR 2% (P2), T-KT 100% + FR 3% (P3), T-KT 100% + FR 4% (P4), T-KT 100% + FR 5% (P5).

Penampungan dan Evaluasi Semen

Penampungan semen dilaksanakan 2 kali seminggu dengan menggunakan vagina buatan dan kambing betina birahi sebagai pemancing. Semen segar yang diperoleh di evaluasi secara makroskopis yaitu warna, bau, volume, konsistensi dan pH serta secara mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi.

Pengenceran dan Penyimpanan Semen

Semen yang digunakan harus memiliki nilai motilitas diatas 70%, konsentrasi diatas 800×10^6 , dan tingkat abnormalitasnya dibawah 15%. Semen yang layak digunakan kemudian diencerkan menggunakan bahan pengencer yang telah disiapkan berupa tris-kuning telur yang

telah ditambahkan dengan filtrat rosella sesuai dengan masing-masing perlakuan. Semen yang telah diencerkan kemudian dievaluasi (motilitas, viabilitas, dan abnormalitas), setelah itu disimpan pada suhu 3-5°C. Semen yang telah disimpan kemudian kembali dievaluasi setiap 24 jam meliputi motilitas, viabilitas, dan abnormalitas.

Variabel Penelitian

Motilitas spermatozoa (%) ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40x10. Penilaian terhadap persentase spermatozoa motil adalah spermatozoa yang bergerak progresif ditentukan secara subjektif pada 5 lapang pandang berbeda.

Viabilitas spermatozoa (%) diketahui dengan mengamati preparat hasil pewarnaan differensial (eosin-negrosin) menggunakan mikroskop dengan pembesaran 40x10. Spermatozoa hidup memiliki kepala berwarna putih sedangkan yang mati berwarna merah. Hitungan total sperma ≥ 800 sel spermatozoa atau pada 10 lapang pandang berbeda.

Abnormalitas (%) diketahui dengan cara menempatkan preparat hasil pewarnaan differensial di bawah mikroskop dan amati dengan pembesaran 40x10 berdasarkan abnormalitas primer dan sekunder.

Analisis Data

Data yang diperoleh dihitung rata-rata dan standard deviasi dan dianalisis dengan analysis of variance (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji duncan's multiple range test (DMRT). Analisis menggunakan software SPSS 22.0 for windows dan MS office excell 2007.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar Kambing Kacang

Karakteristik semen segar kambing Kacang yang digunakan pada penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Nilai rata-rata volume semen segar yang ditampung dari pejantan kambing kacang (Tabel 3) dalam penelitian ini adalah 0,74 ml, hasil ini lebih rendah dari penelitian yang diperoleh Kusumawati *et al.*, (2017) yaitu 1 ml. Volume hasil penelitian ini berada pada kisaran normal menurut Sekosi *et al.*, (2016) yang melaporkan bahwa volume semen kambing per- ejakulat berkisar antara 0,5-1,5 ml.

Warna semen segar kambing kacang hasil penelitian ini adalah krem dengan konsistensi kental. Hasil ini sesuai dengan pendapat dari Pamungkas *et al.*, (2008) bahwa semen segar kambing PE berwarna krem dengan konsistensi kental, namun lebih baik jika dibandingkan dengan laporan Kusumawati *et al.*, (2017) yaitu berwarna krem dengan konsistensi sedang.

Derajat keasaman/pH semen segar kambing kacang hasil penelitian ini yaitu 6,52. Hasil ini berbeda dari pendapat Kusumawati *et al.*, (2017) yakni pH semen 7, namun berada pada kisaran normal karena menurut Garner & Hafez, (2000) yang melaporkan bahwa setiap

individu memiliki derajat kesamaan yang hampir sama yang berkisar antara 6,4-7,8.

Tabel 1. Karakteristik semen segar kambing kacang

Karakteristik semen	Rerata±standar deviasi
Volume (ml)	0,74±0,42
Warna	Krem
Konsistensi	Kental
pH	6,52±0,16
Gerakan Massa	+++
Konsentrasi (10 ⁶ sel/ml)	2.099,40±116,78
Motilitas (%)	80,00±3,53
Viabilitas (%)	86,58±3,04
Abnormalitas (%)	2,83±0,34

Dari uraian diatas menunjukkan bahwa terjadi perbedaan volume, warna, konsistensi dan pH semen antara hasil penelitian ini dengan hasil penelitian para ahli yang disebabkan karena perbedaan bangsa, umur, ukuran badan, kondisi tubuh, frekuensi dan waktu penampungan, dan pola pemeliharaan (Lubis *et al.*, 2013).

Gerakan massa dari hasil penelitian ini adalah sangat baik (+++), hasil ini sesuai dengan pendapat Inonie *et al.*, (2016) bahwa kambing Boerawa dan Kacang sama-sama memiliki gerakan massa spermatozoa yang sangat baik (+++).

Rerata konsentrasi semen segar dari penelitian ini yaitu 2.099,40±116,78 juta sel/ml. Hasil ini sedikit lebih rendah dari pendapat Tambing *et al.*, (2000) bahwa rataannya yaitu 2.940×10⁶ sel/ml. Sedangkan menurut laporan Evans & Maxwell, (1987) yaitu rata-rata konsentrasi semen kambing normal berada pada kisaran 2.500juta-5.000juta sel/ml.

Dari penelitian ini diperoleh hasil rerata motilitas semen segar yaitu 80%, hasil penelitian ini lebih tinggi dari persentase motilitas semen segar kambing kacang menurut Kusumawati *et al.*, (2017) yaitu 75,2%.

Rata-rata viabilitas semen segar yang diperoleh dari penelitian ini adalah 86,58%, nilai ini lebih rendah dari penelitian yang dilakukan oleh Kusumawati *et al.*, (2017) pada kambing kacang yaitu 95,8%.

Rataan abnormalitas semen segar pada penelitian ini yaitu 2,83%, hal ini menunjukkan bahwa semen segar tersebut layak digunakan karena menurut Sali *et al.*, (2016) bahwa semen yang akan digunakan dalam kegiatan IB harus memiliki persentase abnormalitas <15%.

Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi fertilitas spermatozoa serta merupakan indikator penting dalam menentukan kualitas semen secara umum. Menurut Balai Inseminasi Buatan Lembang persentase motilitas spermatozoa ≥40% masih layak digunakan untuk IB (Nurfirman, 2001). Rataan dan standar deviasi motilitas spermatozoa kambing Kacang dalam pengencer tris-kuning telur (T-KT) yang mengandung berbagai konsentrasi filtrat rosella (FR) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai Rata-Rata Motilitas Spermatozoa

Hari	Perlakuan T-KT-FR(%)					
	P0 (0%)	P1 (1%)	P2 (2%)	P3 (3%)	P4 (4%)	P5 (5%)
0	80,41±3,45 ^a	80,70±3,48 ^a	80,59±3,71 ^a	80,74±3,57 ^a	80,50±3,68 ^a	80,39±3,52 ^a
1	70,11±1,45 ^{bc}	71,61±1,14 ^{abc}	71,78±1,49 ^{ab}	74,55±1,83 ^a	70,52±3,17 ^{bc}	67,78±5,02 ^c
2	60,63±2,21 ^{bc}	61,85±1,64 ^b	62,75±1,43 ^b	66,46±0,84 ^a	60,29±3,35 ^{bc}	57,16±5,05 ^c
3	50,52±5,14 ^{bc}	52,76±2,29 ^b	53,56±2,56 ^{ab}	59,21±1,43 ^a	50,47±4,68 ^{bc}	45,58±7,42 ^c
4	38,39±2,20 ^{bc}	41,00±2,27 ^b	41,24±1,54 ^b	50,73±2,28 ^a	38,31±3,92 ^{bc}	35,78±5,50 ^c
5	26,98±2,90 ^c	31,22±2,26 ^{bc}	33,88±3,21 ^b	42,99±2,19 ^a	30,72±4,16 ^{bc}	27,98±4,91 ^c

Keterangan: ^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Berdasarkan Tabel 2 diatas terlihat bahwa rataan motilitas spermatozoa kambing Kacang pada setiap perlakuan yang disimpan selama 0-5

hari pada suhu 3-5oC mengalami penurunan dengan nilai rata-rata rentang penurunan motilitas spermatozoa kambing Kacang pada

setiap perlakuan tidak sama. Pada kelompok perlakuan P3 masih memperlihatkan persentase pergerakan progresif >40% sampai hari ke-5, sedangkan pada perlakuan kontrol, P1, P2, P4, dan P5 pada hari ke-5 menunjukkan persentase pergerakan spermatozoa progresif <40% dengan rata-rata rentang penurunan motilitas spermatozoa per hari selama 5 hari penyimpanan pada setiap perlakuan dari yang terendah hingga tertinggi yaitu P3 7,55%, P2 9,34%, P1 9,90%, P4 9,96%, P5 10,48%, P0 10,69%. Penurunan persentase motilitas spermatozoa kambing Kacang terjadi seiring dengan lama waktu pendinginan, hal ini diduga terjadi karena ketersediaan energi dalam bahan pengencer semakin berkurang seiring dengan lama waktu penyimpanan, zat-zat nutrisi pada pengencer menjadi toksik karena mengalami reaksi oksidasi selama penyimpanan, meningkatnya radikal bebas sehingga merusak keutuhan membran plasma semen, bertambahnya konsentrasi asam laktat sehingga derajat keasaman meningkat serta terdapat spermatozoa yang mati dan rusak akibat suhu dingin sehingga menjadi racun bagi spermatozoa lain (Rizal dan Herdis, 2005; Wiyanti *et al.*, 2013; Kusumawati *et al.*, 2017). Persentase pergerakan individu yang dihasilkan juga sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti jenis pengencer, zat kimia penyusun ekstender, dan osmolaritas (Urabi *et al.*, 2019).

Hasil analisis statistik menggunakan analisis of variance (ANOVA) dan dilanjutkan dengan duncan's multiple range test (DMRT) terhadap persentase motilitas spermatozoa menunjukkan bahwa pada pengamatan pasca pengenceran (hari ke-0) penambahan FR dalam pengencer T-KT berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa kambing Kacang. Namun pada hari ke-1 hingga hari ke-5 menunjukkan pengaruh yang nyata ($P<0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa kambing kacang. Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa penambahan FR dalam pengencer T-KT dapat mempengaruhi persentase motilitas spermatozoa kambing Kacang. Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi interaksi antara pengencer semen dengan spermatozoa, selain itu komponen pengencer termasuk kandungan FR sudah mempengaruhi metabolisme dan kondisi fisiologi spermatozoa.

Pada hari ke-5 perlakuan kontrol menunjukkan persentase spermatozoa motil lebih rendah secara tidak nyata ($P>0,05$) dari P5 dan lebih rendah secara nyata ($P<0,05$)

dibandingkan dengan perlakuan P1, P2, P3 dan P4. Rendahnya persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan kontrol diduga terjadi karena pengencer T-KT hanya berfungsi sebagai sumber nutrisi dan bersifat sebagai penyangga dan anti cold shock namun tidak bersifat sebagai antioksidan. Hal ini didukung oleh Widjaya, (2011); Iskandari *et al.*, (2020), yang berpendapat bahwa dalam pengencer T-KT terkandung bahan seperti tris aminomethane, asam sitrat, raffinosa dan kuning telur yang berfungsi sebagai sumber nutrisi dan bersifat sebagai penyangga untuk mempertahankan pH semen dari adanya kejutan dingin.

Pada perlakuan P1 menunjukkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dari perlakuan P2 dan P3, namun lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari P4 dan lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari P0 dan P5 serta lebih tinggi secara tidak nyata ($P>0,05$) dari P4. Perlakuan P2 juga menunjukkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dari P3, namun lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari perlakuan lainnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa kandungan antioksidan dalam FR pada perlakuan P1 dan P2 belum efektif dalam mencukupi kebutuhan spermatozoa untuk mempertahankan motilitasnya. Hal ini didukung oleh Devipriya *et al.*, (2007); dan Setyaningsih, (2011) yang berpendapat bahwa kandungan antioksidan yang diberikan dalam dosis yang rendah belum efektif dalam menangkal radikal bebas.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan 3% (P3) merupakan perlakuan terbaik dan lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari perlakuan kontrol, P1, P2, P4, P5. Kondisi ini diduga terjadi karena jumlah kandungan nutrisi dan senyawa antioksidan yang terkandung dalam FR pada level 3% diduga merupakan jumlah yang dibutuhkan untuk mempertahankan motilitas spermatozoa dan mencegah terjadinya kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas. Hal ini didukung oleh pendapat Bebas & Gorda, (2016); dan Yahaq *et al.*, (2019) bahwa kerusakan membran plasma spermatozoa karena peroksidasi lipid yang disebabkan oleh radikal bebas dapat dicegah dengan menambahkan antioksidan dalam pengencer.

Pada kelompok perlakuan P4 menunjukkan persentase motilitas spermatozoa lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari P0 dan P5, namun lebih rendah secara tidak nyata ($P>0,05$) dari P1 dan lebih rendah secara nyata

($P < 0,05$) dari P2, dan P3. Pada kelompok perlakuan P5 juga menunjukkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan, P1, P2, P3 dan P4, namun lebih tinggi secara tidak nyata ($P > 0,05$) dari P0. Hasil ini membuktikan bahwa penambahan FR 4% dan 5% dalam pengencer T-KT justru menurunkan persentase motilitas spermatozoa kambing Kacang dan merupakan level yang dapat menyebabkan toksik bagi spermatozoa, karena penambahan dosis antioksidan yang terlalu banyak. Hal ini didukung oleh pendapat Savitri *et al.*, (2014), bahwa pemberian antioksidan dalam jumlah banyak dapat mempengaruhi laju oksidasi yang mengakibatkan hilangnya aktivitas antioksidan serta antioksidan tersebut bisa menjadi prooksidan.

Senyawa antioksidan yang terkandung dalam 100 g kelopak bunga rosela yaitu vitamin C 214,68 mg, vitamin E 4,9 mg, polifenol dan β -karoten 285 mg (Maryani & Kristiana, 2005). Vitamin C dan vitamin E berperan dalam meningkatkan laju laju fruktolisis untuk memenuhi kebutuhan energi spermatozoa, selain itu vitamin C dan E merupakan antioksidan yang dapat menangkal senyawa-senyawa radikal bebas dan mengatasi terbentuknya degradasi oksidatif lipid sehingga glikolisis dan motilitas tidak terganggu (Rosmaidar *et al.*, 2014). Senyawa polifenol yang terdapat pada kelopak bunga rosella yaitu asam fenolik, flafonoid (antosianin), flavonol dan flavon. Senyawa polifenol tersebut berfungsi sebagai antioksidan karena mampu mencegah terbentuknya radikal

bebas dalam tubuh (Ali *et al.*, (2005); dan Putri *et al.*, (2014). Selain vitamin C, vitamin E dan senyawa polifenol, didalam kelopak bunga rosella juga terdapat senyawa β -karoten yang diduga mampu memperbaiki kualitas spermatozoa. Siahaan *et al.*, (2012) berpendapat bahwa β -karoten adalah senyawa antioksidan yang larut dalam lemak yang berfungsi untuk memotong reaksi berantai peroksidasi lipid pada membran plasma sel yang berasal dari radikal bebas.

Hasil motilitas spermatozoa pada penelitian ini lebih tinggi dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Marawali *et al.*, (2019), dengan rata-rata persentase motilitas 53,40% selama 3 hari penyimpanan pada pengencer filtrat jambu biji dalam pengencer air kelapa-kuning telur pada semen cair sapi bali dengan suhu 5oC. Hafez & Hafez, (2000), menyatakan bahwa perbedaan persentase motilitas dipengaruhi oleh usia sperma, maturasi sperma, penyimpanan energi, agen aktif, fisiologik, cairan suspensi dan adanya hambatan.

Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Kusumawati *et al.*, (2016), mengatakan bahwa untuk keperluan inseminasi buatan (IB) maka spermatozoa yang digunakan harus memiliki persentase viabilitas spermatozoa $\geq 50\%$. Hasil pengamatan nilai rata-rata dan standar deviasi viabilitas spermatozoa dalam pengencer tris-kuning telur (T-KT) yang mengandung berbagai level filtrat rosella (FR) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Rata-Rata Viabilitas Spermatozoa

Hari	Perlakuan T-KT-FR(%)					
	P0 (0%)	P1 (1%)	P2 (2%)	P3 (3%)	P4 (4%)	P5 (5%)
0	86,44±2,18 ^a	86,48±2,23 ^a	86,62±2,49 ^a	86,70±2,45 ^a	86,54±2,15 ^a	86,46±2,11 ^a
1	73,83±1,15 ^b	74,76±1,16 ^b	76,31±1,97 ^b	81,21±1,67 ^a	72,65±3,72 ^{bc}	70,00±4,68 ^c
2	64,31±2,47 ^b	65,30±2,39 ^b	67,42±1,54 ^b	73,22±0,92 ^a	63,37±3,50 ^b	59,43±5,12 ^c
3	54,61±5,10 ^b	56,88±2,80 ^b	57,96±2,54 ^b	65,90±1,67 ^a	53,65±4,48 ^{bc}	48,08±7,80 ^c
4	42,17±1,91 ^{bc}	44,67±2,30 ^b	45,30±1,32 ^b	56,85±2,51 ^a	41,54±3,83 ^{bc}	38,26±5,31 ^c
5	31,46±3,37 ^c	35,10±2,34 ^{bc}	38,00±3,20 ^b	49,30±2,24 ^a	33,74±4,45 ^{bc}	30,42±5,26 ^c

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Berdasarkan Tabel 3 diatas menunjukkan bahwa rataan persentase viabilitas spermatozoa kambing Kacang dalam pengencer T-KT dengan penambahan FR yang disimpan selama 0-5 hari pada suhu 3-5oC mengalami penurunan. Tingkat penurunan persentase viabilitas spermatozoa setelah pendinginan terjadi secara bertahap dan

berbeda-beda antar kelompok perlakuan. Pada perlakuan kontrol (P0), 1% (P1), 2% (P2), 3% (P3), 4% (P4) dan P5 pada hari ke-5 menunjukkan spermatozoa hidup $< 50\%$, namun pada perlakuan 3% pada hari tersebut masih memperlihatkan persentase motilitas mendekati 50%. Nilai rata-rata rentang penurunan motilitas

spermatozoa per hari selama 5 hari penyimpanan pada setiap perlakuan berturut-turut dari yang terendah hingga tertinggi yaitu P3 7,48%, P2 9,72%, P1 10,28%, P4 10,56%, P0 11,00% dan P5 11,21%.

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa terjadi karena selama penyimpanan pada suhu dingin terjadi perubahan struktur dari fosfolipid membran plasma yang mengakibatkan fungsi dan permeabilitas membran plasma sel terganggu (Cotter *et al.*, 2005). Sukmawati *et al.* (2014), berpendapat bahwa jika kerusakan membran plasma sel terjadi, maka akan mengganggu proses metabolisme dan proses sintesa Adenosin Tri Fosfat (ATP) terhambat sehingga menyebabkan viabilitas spermatozoa menurun. Selain itu menurunnya persentase viabilitas spermatozoa selama masa penyimpanan pada suhu dingin karena energi yang terkandung dalam pengencer berkurang sedangkan energi yang dibutuhkan oleh spermatozoa semakin tinggi dan konsentrasi asam laktat dalam pengencer meningkat (Hafez and Hafez 2000; dan Kusumawati *et al.* 2017). Wiyanti *et al.* (2013), menambahkan bahwa zat-zat yang terdapat pada pengencer yang digunakan menjadi toksik karena mengalami reaksi oksidasi selama penyimpanan dan meningkatkan radikal bebas yang merusak keutuhan membran plasma spermatozoa. Selama penyimpanan pada suhu dingin spermatozoa akan mengalami kerusakan akibat stres oksidatif yang menyebabkan terjadinya penurunan pada viabilitas spermatozoa (Amtiran *et al.*, 2020).

Hasil analisis statistik menggunakan analisis of variance (ANOVA) yang dilanjutkan dengan duncan's multiple range test (DMRT) terhadap persentase viabilitas spermatozoa menunjukkan bahwa pada pengamatan pasca pengenceran (hari ke-0) penambahan FR dalam pengencer T-KT berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa kambing kacang. Namun setelah 1-5 hari penyimpanan pada suhu dingin menunjukkan pengaruh yang nyata ($P<0,05$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa kambing kacang. Hasil ini mengindikasikan bahwa telah terjadi interaksi antara bahan pengencer dengan spermatozoa, selain itu kandungan FR dalam pengencer memberikan pengaruh positif terhadap spermatozoa dalam mempertahankan viabilitasnya. Inonie *et al.* (2016), menyatakan bahwa persentase viabilitas spermatozoa sangat berkaitan dengan tingkat fertilitas spermatozoa, dimana semakin tinggi

persentase viabilitas maka semakin tinggi pula tingkat fertilitasnya.

Pada perlakuan kontrol (P0) menunjukkan bahwa persentase spermatozoa hidup lebih tinggi secara tidak nyata ($P>0,05$) dibandingkan dengan P5, namun lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dari P1, P2, P3 dan P4. Pada perlakuan P1 menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dengan perlakuan P2 dan P3, namun lebih tinggi secara tidak nyata ($P>0,05$) dari P4, serta lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari perlakuan P5. Pada perlakuan P2 menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dari P3, namun lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari P0, P1, P4 dan P5. Pada perlakuan P3 merupakan perlakuan terbaik dan lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari perlakuan kontrol maupun perlakuan lainnya dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Pada kelompok perlakuan P4 menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dibandingkan dengan P2 dan P3, dan lebih rendah secara tidak nyata ($P>0,05$) dari perlakuan P1, serta lebih tinggi secara nyata ($P<0,05$) dari perlakuan P0 dan P5. Pada kelompok perlakuan P5 juga menunjukkan persentase motilitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dengan perlakuan P1, P2, P3 dan P4, serta lebih rendah secara tidak nyata ($P>0,05$) dari P0.

Hasil ini membuktikan bahwa penambahan filtrat rosella 3% dalam pengencer T-KT dapat mempertahankan kondisi fisiologis pengencer, sehingga persentase viabilitas spermatozoa dapat dipertahankan. Keadaan ini terjadi karena dalam filtrat rosella terkandung vitamin C, vitamin E, β -karoten dan polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan. Kandungan antioksidan tersebut dapat meningkatkan laju fruktolisis sehingga kebutuhan energi untuk kelangsungan hidup spermatozoa dapat terpenuhi. Selain itu kandungan vitamin C, vitamin E, β -karoten, dan polifenol dapat menangkal radikal bebas sehingga pembentukan peroksidasi lipid yang merusak membran plasma sel spermatozoa dapat dicegah (Siahaan *et al.* 2012; Lubis *et al.* 2013; Putri *et al.* 2014).

Akan tetapi penambahan filtrat rosella melebihi 3% dalam pengencer T-KT pada penelitian ini justru menurunkan persentase viabilitas kambing Kacang setelah pendinginan. Keadaan ini kemungkinan terjadi karena semakin tinggi konsentrasi filtrat rosella yang

diberikan akan meningkatkan kandungan antioksidan dalam pengencer, sehingga mempercepat laju fruktolisis dan terjadi peningkatan konsentrasi asam laktat dalam pengencer yang menyebabkan menurunnya pH semen dan selanjutnya mengakibatkan menurunnya aktivitas enzim-enzim metabolisme, akibatnya energi yang dibutuhkan spermatozoa untuk bertahan hidup tidak terpenuhi. Tingginya kandungan antioksidan dalam pengencer juga dapat beralih fungsi menjadi prooksidan yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif pada sel spermatozoa (Savitri *et al.*, 2014).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa persentase viabilitas spermatozoa yang diperoleh pada semua kelompok perlakuan penambahan filtrat rosella lebih tinggi dari persentase motilitas spermatozoa yang diperoleh pada perlakuan kontrol. Hal tersebut disebabkan karena adanya spermatozoa yang tidak motil namun masih hidup sehingga tidak terjadi penyerapan warna dari larutan eosin-negrosin yang diberikan (Susilowati, 2010).

Persentase viabilitas spermatozoa hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan Rosmaidar *et al.*, (2014), dengan rata-rata persentase viabilitas spermatozoa sebesar 62,40% menggunakan sari buah tomat dalam pengencer sitrat kuning telur pada spermatozoa kambing boer. Perbedaan ini disebabkan oleh sifat fisik, kimiawi dan kadar bahan pengencer, suhu dan cahaya dalam perlakuan, penyimpanan sperma, tekanan osmotik, elektrolit dan non elektrolit (Toelihere, 1993).

Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Struktur sel yang abnormal akan menyebabkan terjadinya gangguan pada saat fertilisasi, sehingga salah satu indikator penting yang harus diketahui dalam menentukan kualitas spermatozoa adalah dengan mengetahui persentase abnormalitas spermatozoa (Afiati *et al.*, 2015). Rata-rata dan standar deviasi abnormalitas spermatozoa dari setiap perlakuan yang ditambahkan filtrat rosella (FR) dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai rata-rata abnormalitas spermatozoa

Hari	Perlakuan T-KT-FR(%)					
	P0 (0%)	P1 (1%)	P2 (2%)	P3 (3%)	P4 (4%)	P5 (5%)
0	2,86±0,67 ^a	2,68±0,58 ^a	2,83±0,55 ^a	3,10±0,52 ^a	2,82±0,36 ^a	2,73±0,54 ^a
1	3,20±0,57 ^a	3,06±0,61 ^a	3,01±0,47 ^a	3,13±0,40 ^a	3,19±0,58 ^a	3,26±0,42 ^a
2	3,64±0,47 ^{ab}	3,53±0,39 ^{ab}	3,72±0,43 ^{ab}	3,43±0,31 ^b	3,66±0,33 ^{ab}	4,03±0,41 ^a
3	4,07±0,54 ^a	3,98±0,51 ^a	4,05±0,51 ^a	3,84±0,53 ^a	4,17±0,53 ^a	4,47±0,43 ^a
4	4,42±0,49 ^{ab}	4,13±0,50 ^b	4,23±0,53 ^{ab}	4,00±0,51 ^b	4,35±0,52 ^{ab}	4,87±0,48 ^a
5	4,80±0,47 ^{ab}	4,66±0,46 ^{ab}	4,30±0,62 ^b	4,12±0,49 ^b	4,73±0,48 ^{ab}	5,17±0,35 ^a

^{a,b,c,d} Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Pada Tabel 4 diatas menunjukkan bahwa rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa kambing Kacang dalam pengencer T-KT dengan penambahan FR mengalami kenaikan seiring dengan lama waktu pendinginan. Kenaikan persentase abnormalitas spermatozoa diduga terjadi karena proses pembentukan spermatozoa yang tidak sempurna, kerusakan yang timbul akibat cara pengkoleksian semen dan pada proses pengenceran semen serta pembuatan ulasan untuk pengamatan. Hal ini didukung oleh Solihati dan Kune (2009); Hastuti dan Riviani (2020), bahwa peningkatan abnormalitas spermatozoa dipengaruhi oleh ketidak-normalan proses spermatogenesis dalam tubulus seminiferi, proses pengenceran dan pembuatan preparat ulas serta lamanya waktu penyimpanan. Selain disebabkan saat pembuatan preparat ulas

untuk pengamatan, persentase abnormalitas spermatozoa juga disebabkan oleh peroksidasi lipid yang terjadi akibat reaksi asam lemak tak jenuh dan radikal bebas yang menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa (Suyadi *et al.*, 2012; Fafu *et al.*, 2016).

Namun rentang kenaikan abnormalitas spermatozoa yang terjadi tidak terlalu drastis dan tergolong rendah, dimana pada pengamatan pasca pengenceran (hari ke-0) hingga pada pengamatan 5 hari setelah penyimpanan pada suhu dingin menunjukkan rentangan persentase abnormalitas spermatozoa dalam kisaran normal yaitu berkisar antara 2,68-5,17%. Hasil penelitian ini sesuai dengan standar Inseminasi Buatan (IB) menurut Sekosi *et al.*, (2016), bahwa untuk keperluan IB semen yang digunakan harus mengandung abnormalitas

spermatozoa <20%. Saili *et al.*, (2016), menambahkan bahwa standar persentase abnormalitas spermatozoa kambing untuk keperluan IB adalah $\leq 15\%$.

Kisaran persentase abnormalitas spermatozoa hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian (Hidayah, 2018) tentang penambahan filtrat daun kelor dalam pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas semen kambing Kacang pada suhu $5 \square C$ selama 4 hari penyimpanan dengan kisaran 8,20-17,00%. Perbedaan ini dipengaruhi oleh kecerobohan pada saat perlakuan, perbedaan isotonis pada bahan pengencer yang digunakan, dan kejutan dingin (Susilawati, 2011).

Rendahnya rentang kenaikan abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini diduga terjadi karena didalam pengencer T-KT terdapat kandungan zat-zat nutrisi yang mampu mencegah terjadinya peningkatan abnormalitas spermatozoa akibat suhu dingin. Hal tersebut didukung oleh pendapat Effendi *et al.*, (2015), bahwa dalam kuning telur terkandung lesitin dan lipoprotein yang berfungsi untuk mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa dan mencegah terjadinya cold shock. Selain itu rendahnya rentang kenaikan abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini diduga terjadi karena kandungan antioksidan dalam FR dapat menangkal radikal bebas sehingga kerusakan spermatozoa dapat dicegah.

Hasil analisis statistik menggunakan analisis of variance (ANOVA) dan dilanjutkan dengan duncan's multiple range test (DMRT) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa kambing Kacang menunjukkan bahwa pada pengamatan hari ke-0 dan hari ke-1 penambahan FR dalam pengencer T-KT berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa kambing Kacang. Namun pada hari ke-2 hingga hari ke-5 menunjukkan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa kambing kacang, dimana persentase abnormalitas dari terendah sampai tertinggi berturut-turut pada hari terakhir pengamatan yaitu P3 (4,12%), P2 (4,30%), P1 (4,66%), P4 (4,73%), P0 (4,80%) dan P5 (5,17%). Hasil analisis tersebut menunjukkan

bahwa penambahan FR dalam pengencer T-KT dapat mempengaruhi persentase abnormalitas spermatozoa kambing Kacang. Hal tersebut mengindikasikan bahwa telah terjadi interaksi antara pengencer semen dengan spermatozoa, selain itu komponen pengencer termasuk kandungan FR sudah mempengaruhi metabolisme dan kondisi fisiologis pengencer.

Penambahan FR dengan dosis 3% merupakan perlakuan terbaik dimana pada hari ke-0 perlakuan tersebut menunjukkan persentase abnormalitas tertinggi dari semua perlakuan namun setelah 5 hari penyimpanan perlakuan P3 menunjukkan persentase abnormalitas spermatozoa terendah secara nyata ($P < 0,05$) dari semua perlakuan. Hasil tersebut membuktikan bahwa penambahan FR 3% kedalam pengencer T-KT memberikan respon positif terhadap spermatozoa, Karena FR pada dosis 3% mempunyai senyawa antioksidan yang diduga sesuai dengan kebutuhan spermatozoa untuk mengatasi dan mengurangi kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas sehingga dapat menekan angka abnormalitas spermatozoa yang terjadi. Selain itu penambahan antioksidan dalam pengencer dapat mengatasi kerusakan membran plasma spermatozoa akibat adanya peroksidasi lipid yang disebabkan oleh radikal bebas (Bebas and Gorda, 2016; dan Yahaq *et al.*, 2019).

Pada kelompok perlakuan 5% menunjukkan persentase abnormalitas spermatozoa yang lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan kontrol, P1, P2, P3, dan P4. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan 5% dalam pengencer T-KT justru menurunkan persentase abnormalitas spermatozoa kambing Kacang dan merupakan dosis yang dapat menyebabkan toksik bagi spermatozoa karena mengandung senyawa antioksidan dalam jumlah yang banyak melebihi kebutuhan spermatozoa. Selain itu pemberian antioksidan dalam jumlah banyak dapat mempengaruhi laju oksidasi yang menyebabkan aktivitas antioksidan menghilang serta antioksidan tersebut bisa berubah menjadi prooksidan (Savitri *et al.*, 2014).

SIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah penambahan filtrat rosella dalam pengencer tris-kuning telur memiliki pengaruh yang baik dan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa kambing kacang. Pada penambahan dosis 3% filtrat rosella menunjukkan persentase tertinggi

merupakan dosis terbaik dibanding dengan ke lima perlakuan lainnya dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa kambing kacang yang disimpan selama 5 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62(6): 1160-1172.
- Afiati F, Yulnawati, Riyadi M, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 1(4): 930-934.
- Ali BH, Wabel NA, Blunden G. 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of Hibiscus sabdariffa L.: A review. *Phytotherapy Research* 19(5), 369-375.
- Am tiran DE, Hine TM, Uly K. 2020. Pengaruh Penambahan Vitamin E dalam Pengencer Tris-Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Duroc. *Jurnal Peternakan Lahan Kering*, 2(4): 1111-1118.
- Bebas W, Gorda W. 2016. Penambahan astaxanthin pada pengencer kuning telur berbagai jenis unggas dapat memproteksi semen babi selama penyimpanan. *Jurnal Veteriner* 17(4): 484-491.
- Cotter PZ, Goolsby HA, Prien SD. 2005. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 40(2): 98-99.
- Devipriya N, Srinivasan M, Sudheer AR, Menon VP. 2007. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: A drug dose dependent study. *Singapore Medical Journal* 48(4): 311-318.
- Effendi FI, Wahjuningsih S, Ihsan MN. 2015. Pengaruh pengencer tris aminomethane kuning telur yang disuplementasi sari kulit manggis (*Garcinia Mangostana*) terhadap kualitas semen sapi limousin selama penyimpanan suhu dingin 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 25(3): 69-79.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. Salamons' Artificial Insemination Of Sheep And Goats (Ed. 2). Butterworths.
- 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* 3(2): 184-195.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa And Seminal Plasma. In *Reproduction In Farm Animals*, 96-109.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. X and Y Chromosome-Bearing Spermatozoa. In *Reproduction in Farm Animals*: 390-394.
- Hastuti DWB, Riviani. 2020. Efektifitas penggunaan jenis ekstender dan dosis madu berbeda terhadap motilitas dan viabilitas sperma ikan nilam (*Osteochilus vittatus*) setelah penyimpanan. *Jurnal Airaha* 9(2): 122-129.
- Hidayah SN. 2018. Pengaruh level filtrat daun kelor (*Moringa oleifera*) pada pengencer tris kuning telur ayam kampung dalam mempertahankan kualitas spermatozoa kambing kacang pada suhu 5°C. Disertasi. Universitas Mataram.
- Inonie RI, Baa LO, Saili T. 2016. Kualitas spermatozoa kambing boerawa dan kambing kacang pada penggunaan tris-kuning telur yang berbeda. *JITRO* 3(1): 52-64.
- Iskandari NN, Madyawati SP, Wibawati PA, Suprayogi TW, Prastiya RA, Agustono B. 2020. Perbandingan pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur terhadap persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa kambing sapera pada penyimpanan suhu 5°C. *Jurnal Medik Veteriner* 3(2): 196-202.
- Kusumawati ED, Krisnaningsih ATN, Romadlon RR. 2016. Kualitas

- spermatozoa semen beku sapi Simental dengan suhu dan lama thawing yang berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 26(3): 38-41.
- Kusumawati ED, Utomo KN, Krisnaningsih ATN, Rahadi S. 2017. Kualitas semen kambing kacang dengan lama simpan yang berbeda pada suhu ruang menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur. *JITRO* 4(3): 42-51.
- Lubis TM, Dasrul, Thasmi CN, Akbar T. 2013. Spermatozoa after cold storage. *Sains Pertanian* 3(1): 347-61.
- Marawali A, Abdullah MS, Jalaludin. 2019. Efektivitas suplementasi filtrat jambu biji dalam pengencer airkelapa-kuning telur terhadap kualitas semen cair sapi bali. *Jurnal Veteriner* 20(1): 20-29.
- Maryani H, Kristiana L. 2005. Khasiat & Manfaat Rosela (Revisi). Astuti & Purwa (eds.). Jakarta, Agromedia Pustaka.
- Nurfirman. 2001. Efektifitas medium beltsville poultry semen extender (BPSE) terhadap kualitas semen cair ayam lokal. Bogor Agricultural University (IPB).
- Pamungkas FA, Mahmilia F, Elieser S. 2008. Perbandingan karakteristik semen kambing boer dengan kacang. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner*, 367-370.
- Putri DD, Nurmagustina DE, Chandra AA. 2014. Kandungan total fenol dan aktivitas antibakteri kelopak buah rosela merah dan ungu sebagai kandidat feed additive alami pada broiler. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan* 14(3): 174-180.
- Rizal M, Herdis. 2005. Daya hidup spermatozoa epididimis domba garut yang dikriopreservasi menggunakan modifikasi pengencer tris. *Hayati Journal of Biosciences* 12(2): 61-66.
- Rosmaidar, Dasrul, Lubis TM. 2014. Pengaruh penambahan sari buah tomat dalam media pengencer terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing boer yang disimpan pada suhu 3-5°C. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 1(1): 7-17.
- Saili T, Baa LO, Sani LOA, Rahadi S, Sura IW, Lopulalan F. 2016. Sinkronisasi estrus dan inseminasi buatan menggunakan semen cair hasil sexing pada sapi bali induk yang dipelihara dengan sistem yang berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak* 16(2): 49-55.
- Savitri FK, Suharyatib S, Siswanto. 2014. Kualitas semen beku sapi bali dengan penambahan berbagai dosis vitamin c pada bahan pengencer skim kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 2(3): 30-36.
- Sekosi PPP, Kusumswati ED, Krisnaningsih ATN. 2016. Motilitas dan viabilitas semen segar kambing peranakan etawa (pe) dengan menggunakan pengencer cauda epididymal plasma (CEP-2) pada lama dan suhu simpan yang berbeda. *Jurnal Sains Peternakan* 4(1): 34-39.
- Setyaningsih VR. 2011. Pengaruh pemberian infus simplisia rosella (*Hibiscus subdariffa L*) secara oral terhadap kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus L*) jantan galur DDT. *Skripsi*. Depok, Universitas Indonesia.
- Siahaan EA, Laksmi DNDI, Bebas W. 2012. Efektivitas penambahan berbagai konsentrasi β -karoten terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali post thawing. *Indonesia Medicus Veterinus* 1(2): 239-251.
- Situmorang P. 2002. Pengaruh kolesterol terhadap daya hidup dan fertilitas spermatozoa sapi. *JITV* 7(4): 251-258.
- Solihati N, Kune P. 2009. Pengaruh jenis pengencer terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa semen cair sapi Simmental. *Seminar Nasional Peternakan Dan Veteriner*: 1-6.
- Sukmawati E, Arifiantini L, Purwantara B. 2014. Daya Tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. *Jurnal Ilmu Ternak Dan Veteriner* 19(3): 168-175.
- Susilawati T. 2011. Spermatology. Universitas Brawijaya Press.
- Susilowati S. 2010. Efek waktu sentrifugasi terhadap motilitas, daya tahan hidup dan tudung akrosom spermatozoa kambing. *Veterinaria Medika* 3(1): 61-64.
- Suyadi AR, Iswanto N. 2012. Effect of α - Tocopherol in Tris-Aminomethane – Egg Yolk on the Semen Quality during Cold Storage in Boer goats. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 22(3): 1-8.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Sutarna IK. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing peranakan etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5(2): 1-8.

- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Urabi D, Farida, Lestari TP. 2019. Pengaruh Penambahan Madu Pada Pengenceran Sperma Terhadap Motilitas Spermatozoa Ikan Baung (*Mystus Nemurus*). *Jurnal Ruaya* 7(2): 47-54.
- Widjaya N. 2011. Pengaruh pemberian susu skim dengan pengencer tris kuning telur terhadap daya tahan hidup spermatozoa sapi pada suhu penyimpanan 5°C. *Sains Peternakan* 9(2): 72-76.
- Wiyanti DC, Isnaini N, Trisunuwati P. 2013. Pengaruh lama simpan semen dalam pengencer NaCl fisiologis pada suhu kamar terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung (*Gallus domesticus*). *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(1): 53-55.
- Yahaq MA, Ondho YS, Sutiyono. 2019. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Semen Sapi Limousin yang Dibekukan Terhadap Kualitas Post Thawing. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia* 14(4): 380-386.