

PENGUJIAN EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN KELOR DALAM PENGECER SITRAT-KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR BABI LANDRACE

(THE EFFECTIVITY OF MORINGA LEAF EXTRACT CONCENTRATION IN CITRATE EGG-YOLK DILUENT ON THE QUALITY OF LANDRACE LIQUID SEMEN)

Melianus Fafo, Thomas Mata Hine, Wilmientje Marlene Nalley

Fakultas Peternakan, Universitas Nusa Cendana, Jln Adisucipto Penfui, Kupang 85001

Email : melianusfafo@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas dan konsentrasi terbaik ekstrak daun kelor (EDK) dalam pengencer Sitrat-Kuning telur (SKT) terhadap kualitas semen cair babi landrace. Semen dikoleksi dua kali seminggu menggunakan metode masase dari tiga ekor babi jantan landrace berumur 3 tahun dengan kondisi organ reproduksi yang normal. Semen yang menunjukkan kualitas yang baik dibagi empat, masing-masing diencerkan dengan SKT (P0), SKT + EDK 5% (P1), SKT + EDK 12,5% (P2), SKT + EDK 22,5% (P3) dan SKT + EDK 35% (P4). Semen yang telah diencerkan disimpan dalam styrofoam pada suhu 18-20°C dan dievaluasi motilitas, viabilitas, abnormalitas serta keutuhan membran plasma sperma setiap 4 jam. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap yang terdiri atas lima perlakuan dan empat ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa yang disimpan selama 24 jam dalam pengencer SKT + EDK 5% (P1) memiliki motilitas $42 \pm 7,58\%$ dan viabilitas $63,62 \pm 13,24\%$ lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada ketiga pengencer lainnya, sedangkan abnormalitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa dalam keempat pengencer berbeda tidak nyata ($P > 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah EDK yang ditambahkan ke dalam pengencer SKT efektif dalam mempertahankan kualitas semen cair babi landrace dengan konsentrasi ekstrak daun kelor terbaik adalah 5%.

Kata kunci: Sitrat, kuning telur, ekstrak daun kelor, semen cair, babi landrace.

ABSTRACT

The aims of the present study were to evaluate the effectiveness and the best concentration of moringa leaf extracts (MLE) in Citrate-egg yolk (CEY) diluent on the quality of liquid semen of landrace boar. The semen samples were collected twice weekly from three landrace boars (2-3 years old) in normal reproductive performance following the massage method. The good quality sample was divided into five tubes, each diluted with CEY (P0), CEY + MLE 5% (P1), CEY + MLE 12.5% (P2), CEY + MLE 22.5% (P3) and CEY + MLE 35% (P4) following a completely randomized design consisting of five treatments and four replications. The diluted samples then stored in a styrofoam at a temperature of 18-20°C and were evaluated for motility, viability, plasma membrane abnormalities as well as the integrity of every 4 hours. The results showed that the spermatozoa kept during 24 hours in a diluent of CEY + MLE 5% (P1) had higher ($P < 0.05$) motility ($42 \pm 7.58\%$) and viability ($63.62 \pm 13.24\%$) than the other three diluents. However, there were no significant different ($P > 0.05$) between treatments for the abnormalities and plasma membrane integrity of spermatozoa. Adding moringa leaf extracts (MLE) into Citrate-egg yolk (CEY) is effectively maintaining the quality of liquid semen of landrace boar at the best concentration of 5% moringa leaf extract (MLE)

Keywords: citrate, egg yolk, moringa leaf extract, liquid semen, landrace boar

PENDAHULUAN

Pencapaian tujuan program inseminasi buatan (IB) tergantung pada beberapa faktor diantaranya adalah kualitas semen yang digunakan (Tamoës *et al.*, 2014). Semen segar tidak bertahan lama dalam penyimpanan *in vitro* yang diakibatkan oleh adanya kematian sperma yang berlangsung secara cepat. Salah satu penyebab kematian sperma adalah adanya serangan radikal bebas sebagai hasil dari proses transpor elektron di mitokondria terhadap membran plasma sperma (Hammerstedt, 1993). Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai satu electron atau yang tidak berpasangan. Prinsip kerjanya adalah akan menimbulkan perubahan kimiawi dan merusak komponen sel hidup seperti protein, karbohidrat, lemak dan nukleotida. Upaya untuk menghambat terbentuknya peroksida lemak dapat dilakukan dengan cara menambahkan antioksidan yaitu suatu zat yang dapat mengikat senyawa radikal bebas.

Daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) mengandung 46 antioksidan, antara lain: vitamin A, vitamin C, dan vitamin E. Daun

kelor juga mengandung vitamin K, vitamin B, alanin, alfa-karoten, arginin, beta-karoten, beta-sitosterol, asam kafeoilkuinat, kampesterol, karotenoid, klorofil, kromium, delta-5-avenasterol, delta-7-avenasterol, glutathion, histidin, asam asetat indol, indoleasetonitril, kaempferal, leucine, lutein, metionin, asam miristat, asam palmitat, prolamin, prolin, kuersetin, rutin, selenium, treonin, triptofan, xantin, xantofil, zeatin, zeasantin, zinc (Kurniasih, 2013).

Dalam penelitian ini ekstrak daun kelor ditambahkan sebagai suplemen dalam pengencer sitrat-kuning telur. Natrium sitrat merupakan penyangga yang mampu mempertahankan kestabilan pH pengencer, sedangkan kuning telur bermanfaat sebagai sumber energi dan lipoprotein yang dapat memberikan perlindungan terhadap spermatozoa selama proses preservasi (Aboagla dan Terada, 2004, Nalley *et al.*, 2011). Hasil penelitian ini Kombinasi antara pengencer sitrat-kuning telur dan ekstrak daun kelor telah terbukti mampu mempertahankan kualitas semen cair babi VDL

METODE PENELITIAN

Penampungan Semen

Ternak yang digunakan sebagai sumber semen dalam penelitian ini adalah 3 ekor babi pejantan *landrace* yang berumur 2-3 tahun, yang berada dalam kondisi sehat, tubuh yang proporsional, mempunyai organ reproduksi normal dan telah terlatih untuk ditampung semennya. Proses penampungan semen pada ternak babi menggunakan metode massage dimana pejantan menaiki betina buatan (Dummy). Alat yang digunakan dalam penampungan semen adalah satu set alat penampungan semen.

Evaluasi Semen

Semen segar hasil ejakulasi yang dievaluasi secara makroskopis yang meliputi volume, warna, bau, konsistensi, pH dan mikroskopis yang meliputi motilitas, viabilitas, konsentrasi, abnormalitas dan MPU. Alat yang

digunakan untuk evaluasi semen adalah mikroskop, obyek glass dan cover glass, heating table, kertas pH, *hemacyometer*, pipet, *open doff*, tabung berskala, centrifuge untuk menghitung konsentrasi dan *conthing chamber* lengkap dengan pipet eritrosit. Semen segar yang memiliki motilitas $\geq 70\%$, konsentrasi $\geq 200 \times 10^6$ sel/ml, viabilitas $\geq 80\%$ dan abnormalitas $\leq 20\%$ yang digunakan dalam penelitian ini.

Pengencer Semen

Bahan yang digunakan sebagai pengencer semen dalam penelitian ini antara lain: eosin 2%, eosin-negrosin, alkohol 70%, aquabidestilata steril, kuning telur, tissue, ekstrak daun kelor, sitrat 2,3% dan antibiotik (penicilin dan streptomycin). Pengencer dasar yang digunakan adalah pengencer sitrat dan kuning telur (S-KT) dan suplementasi ekstrak

daun kelor (EDK). Dimana P0 (S-KT), P1 (S-KT + EDK 5 %), P2 (S-KT + EDK 12,5%), P3 (S-KT + EDK 22,5%) dan P4 (S-KT+EDK 35%).

Penyimpanan Semen

Semen yang diencerkan disimpan dalam Styrofoam dengan suhu 18-20°C dikontrol dengan thermometer dan melakukan evaluasi setiap 4 jam. Alat yang digunakan pada penyimpanan semen adalah es batu, styrofoam, thermometer.

Evaluasi Kualitas Semen Pasca Penyimpanan

Parameter dalam penelitian ini adalah: motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh. Pengamatan dilakukan setiap 4 jam. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari lima perlakuan dan empat ulangan. Data dianalisis dengan sidik ragam dan jika terdapat perbedaan nyata dilanjutkan uji Duncan, dengan program software SPSS 17.0 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas adalah gerak maju ke depan dari spermatozoa secara progresif. Oleh karena tujuan akhir dari pengenceran adalah untuk kegiatan inseminasi buatan maka daya gerak spermatozoa secara progresif (maju ke depan) menjadi patokan yang mutlak diperhitungkan. Kemampuan spermatozoa untuk bergerak progresif memiliki korelasi positif terhadap

tingkat fertilitas spermatozoa, dan oleh karena itu, penilaian motilitas digunakan sebagai ukuran kesanggupan spermatozoa dalam membuahi sel telur atau ovum. Sifat morfologi dan pola metabolisme khusus yang dimiliki oleh spermatozoa menyebabkan spermatozoa mampu bergerak maju ke depan pada lingkungan cair. Motilitas sperma masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Motilitas spermatozoa (%) dalam pengencer sitrat kuning telur dengan level ekstrak daun kelor yang berbeda

Jam pengamatan	Level ekstrak daun kelor (%)				
	P0 (0)	P1 (5)	P2 (12,5)	P3 (22,5)	P4 (35)
0	83±2,74 ^a	84±2,24 ^a	82±2,74 ^a	79±5,48 ^{ab}	74±8,22 ^b
4	77±4,48 ^a	80±0,00 ^a	68±5,71 ^a	40±10,25 ^b	40±16,96 ^b
8	70±7,08 ^a	76±2,24 ^a	51±20,74 ^b	22±2,74 ^c	11±2,24 ^c
12	62±9,09 ^a	65±10,00 ^a	32±24,64 ^b	0±0,00 ^c	0±0,00 ^c
16	52±7,59 ^a	65±6,13 ^a	18±25,65 ^b	0±0,00 ^c	0±0,00 ^c
20	39±16,36 ^a	54±5,48 ^a	10±22,37 ^b	0±0,00 ^b	0±0,00 ^b
24	24±15,17 ^b	42±7,58 ^a	6±13,42 ^c	0±0,00 ^c	0±0,00 ^c

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Berdasarkan Tabel 1 terlihat adanya penurunan motilitas dari masing-masing perlakuan seiring dengan bertambahnya umur penyimpanan. Hal ini mungkin disebabkan oleh semakin berkurangnya energi yang terdapat dalam medium pengencer sehingga mengakibatkan jumlah spermatozoa yang tidak bergerak progresif semakin bertambah banyak. Secara umum, fenomena penurunan motilitas

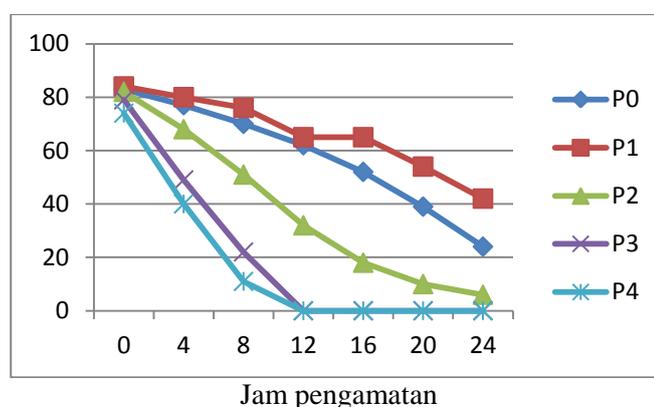
spermatozoa setelah penyimpanan yang lama lebih diakibatkan oleh menurunnya zat makanan spermatozoa dan pengaruh zat toksik hasil sampingan dari proses metabolisme spermatozoa. Rizal *et al.* (2004) menambahkan bahwa motilitas spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP) hasil dari proses metabolisme sel. Penurunan motilitas

juga dapat disebabkan oleh adanya kejutan dingin dan peningkatan konsentrasi asam laktat. Tamoës *et al.*, (2014) menyatakan bahwa pengaruh utama dari kejutan dingin terhadap sel spermatozoa adalah penurunan motilitas dan daya hidup, perubahan permeabilitas dan perubahan komponen lipid pada membran. Suasana asam yang disebabkan oleh penimbunan asam laktat menyebabkan kerusakan organel-organelnya sehingga metabolisme sebagai upaya untuk memperoleh energi terganggu. Berkurangnya metabolisme

mengakibatkan berkurangnya energi yang dihasilkan dan akan menurunkan motilitas.

Penurunan motilitas spermatozoa mulai terjadi pada jam ke-4 penyimpanan yaitu sebesar 6% pada perlakuan P0, 4% pada perlakuan P1, 14% pada perlakuan P2, 39% pada perlakuan P3 dan 34% pada perlakuan P4. Pada jam ke-12 penyimpanan, semua sperma pada perlakuan P3 dan P4 sudah mengalami kematian, sedangkan pada perlakuan P1 jumlah sperma yang motil masih mencapai 65%, P0 = 62% dan P2 = 32% (Gambar 1).

Motilitas (%)



Gambar 1. Penurunan persentase motilitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer sitrat-kuning telur yang disuplementasi berbagai level ekstrak daun kelor

Pada perlakuan P3 dan P4 menunjukkan adanya penurunan persentase motilitas yang sangat tinggi. Hal ini disebabkan karena kemungkinan level EDK sebagai suplementasi dalam pengencer terlalu tinggi. Menurut Fuglie (2001), kandungan vitamin C dalam daun kelor adalah 17,3 mg/100 mg dan vitamin B3 adalah 8,2/100 mg. Penambahan vitamin C dan vitamin B3 pada pengencer semen dapat menyebabkan perubahan pH karena vitamin C bersifat asam. Spermatozoa sangat peka terhadap perubahan pH medium yang dapat berdampak pada penurunan kualitas sperma (Rizal dan Herdis, 2010). Selain itu, daun kelor juga mengandung zat anti nutrisi seperti saponin dan tanin, zat ini bisa bersifat toksik pada spermatozoa pada dosis tinggi. Dengan demikian, pada dosis yang tinggi, ekstrak daun kelor akan menghasilkan efek negatif terhadap kehidupan sperma selama penyimpanan.

Hasil analisis statistik terhadap motilitas spermatozoa pasca pengenceran menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) antara perlakuan P0, P1, P2 dan P3, namun berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan P4. Pada jam ke-12 penyimpanan, antara perlakuan P1 dan P0 menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$), tetapi kedua perlakuan tersebut berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan P2, P3 dan P4. Pada jam ke-24 penyimpanan, motilitas sperma pada perlakuan P1 lebih tinggi ($P < 0,05$) dari keempat perlakuan lainnya, bahkan sperma pada perlakuan P3 dan P4 sudah tidak ada yang motil progresif sejak jam ke-12 penyimpanan. Hal ini memberi gambaran bahwa perlakuan P1 dengan level ekstrak daun kelor sebesar 5% menghasilkan motilitas sperma terbaik dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Pemberian ekstrak daun kelor yang tepat memberikan hasil yang maksimal untuk mencegah peroksidasi lipid pada membran

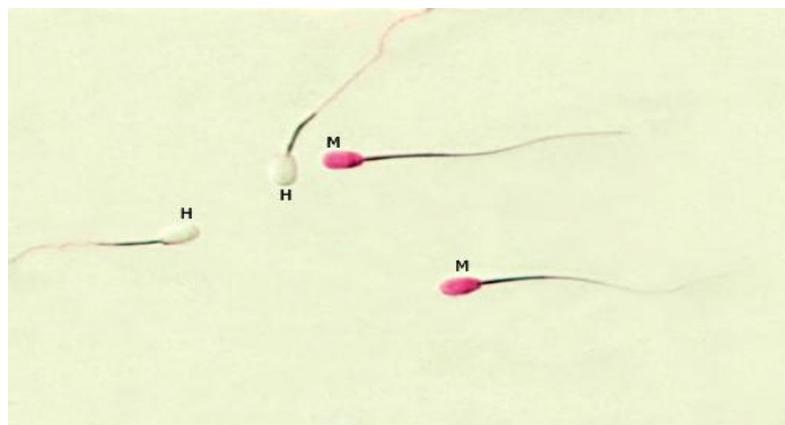
plasma spermatozoa dengan cara mencegah atau memutus reaksi rantai peroksidasi lipid pada membrane plasma spermatozoa, sehingga mampu mengurangi kerusakan yang terjadi pada membran plasma spermatozoa. Kurniasih (2013) menyatakan bahwa daun kelor kaya akan nutrisi, dengan kandungan antioksidan daun kelor sebanyak 46 jenis.

Selain digunakan untuk bahan makanan, daun kelor telah dilaporkan menjadi sumber yang kaya akan makronutrien maupun mikronutrien yang juga mengandung β -karoten, protein, vitamin C, kalsium, dan kalium; dan juga bertindak sebagai sumber antioksidan alami. Makronutrien dan mikronutrien tersebut sangat bermanfaat untuk menunjang motilitas sperma (Johnson *et al.*, 2000). Antioksidan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid, dengan cara menunda atau mencegah terjadinya reaksi outoksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid (Shui *et al.*, 2004).

Dari hasil penelitian motilitas spermatozoa menunjukkan bahwa spermatozoa dalam pengencer sitrat kuning telur dengan penambahan ekstrak daun kelor level 5% secara teknis layak dipakai untuk IB pada babi landrace dengan menggunakan semen cair sampai penyimpanan 24 jam, karena memiliki persentase motilitas progresif di atas 40%.

Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Penilaian viabilitas dilakukan secara obyektif menggunakan pewarnaan diferensial. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa penting dilakukan karena berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa. Menurut Kostaman dan Utama (2006), persentase spermatozoa hidup (viable) lebih tinggi dari pada spermatozoa motil karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semua motil progresif. Spermatozoa yang hidup memiliki kepala berwarna transparan, sedangkan yang mati berwarna merah (Gambar 2). Hal ini disebabkan karena membran plasma secara fisik dan fungsional masih utuh. Eosin yang berikatan dengan natrium sitrat akan masuk kedalam sel, tetapi karena membrane plasma sel masih berfungsi, senyawa Natrium dan eosin ini akan segera dikeluarkan kembali dari dalam sel oleh mekanisme kerja pompa sodium. Hal ini terjadi pula karena secara fisiologik konsentrasi Na di dalam sel lebih rendah daripada diluar sel. Pada sperma mati, membran plasma spermatozoa termasuk pompa sodium sudah rusak, sehingga senyawa natrium dan eosin yang masuk ke dalam sel tidak lagi dipompa keluar dan tetap bertahan didalam sel, dan hal inilah yang mengakibatkan kepala sperma berwarna merah. Dalam perbandingan dengan motilitas, viabilitas sperma ditampilkan pada Tabel 2 lebih tinggi dari motilitas. Hal ini sesuai dengan yang dinyatakan oleh Kostaman dan Sutana (2006) bahwa sperma yang hidup selalu lebih banyak daripada sperma motil karena sperma motil sudah pasti hidup, tetapi sperma yang hidup belum tentu motil.



Gambar 2. Spermatozoa hidup (H) dan spermatozoa yang mati (M)

Tabel. 2. Viabilitas spermatozoa (%) dalam pengencer sitrat kuning telur dengan level EDK yang berbeda

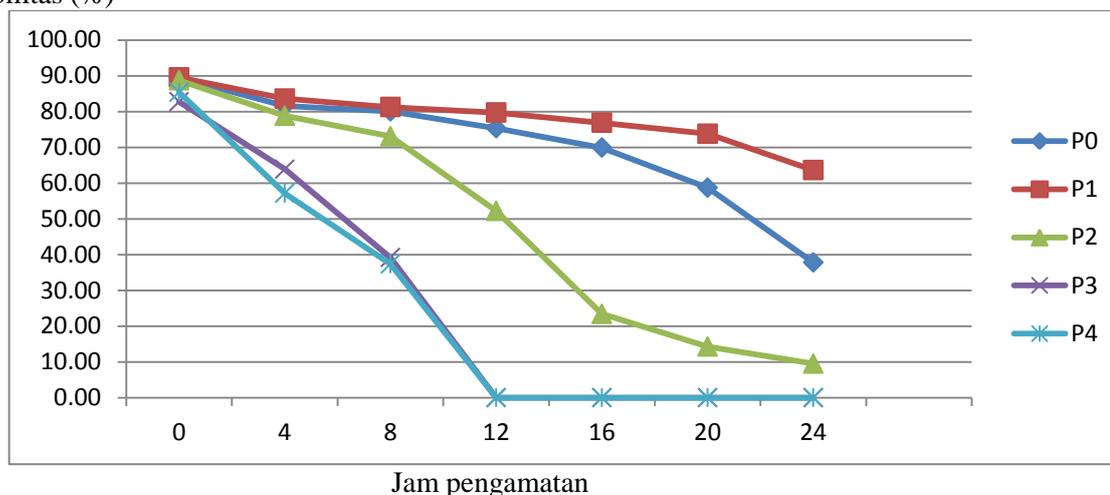
Jam pengamatan	Level ekstrak daun kelor (%)				
	P0 (0)	P1 (5)	P2 (12,5)	P3 (22,5)	P4 (35)
0	89,41±1,08 ^a	89,54±0,57 ^a	88,71±1,23 ^a	82,73±10,20 ^a	85,39±7,44 ^a
4	81,60±4,41 ^a	83,59±1,72 ^a	78,81±4,64 ^a	63,87±17,84 ^b	57,14±13,08 ^b
8	80,04±4,26 ^a	81,26±2,42 ^a	73,08±8,44 ^a	39,20±25,89 ^b	37,38±8,94 ^b
12	75,34±6,13 ^a	79,73±2,69 ^a	52,21±33,05 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c
16	69,91±4,82 ^a	76,89±1,73 ^a	23,42±33,91 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c
20	58,72±19,24 ^a	73,78±3,03 ^a	14,29±31,97 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
24	37,79±21,55 ^b	63,62±13,24 ^a	9,52±21,28 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c

Superskrip yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Dari Tabel 2, terdapat dilihat bahwa setiap perlakuan mengalami penurunan viabilitas spermatozoa pasca pengenceran hingga 24 jam penyimpanan (Gambar 2). Namun sama seperti pada penurunan motilitas, kecepatan penurunan viabilitas dari tiap-tiap perlakuan berbeda-beda. Hal ini mungkin disebabkan

oleh kemampuan dari setiap pengencer yang berbeda dalam menyumbangkan zat-zat makanan yang dibutuhkan untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa dan mampu memperlambat penurunan derajat keasaman yang ditimbulkan karena adanya aktivitas metabolisme spermatozoa.

Viabilitas (%)



Gambar 3. Grafik penurunan persentase viabilitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer EDK yang disuplementasi ekstrak daun kelor

Secara umum, viabilitas sperma tertinggi setelah disimpan selama 24 jam dihasilkan oleh perlakuan P1 yang mencapai 63,62% dan terendah pada perlakuan P3 dan P4 yaitu 0%. Hasil analisis statistik terhadap viabilitas sperma pada jam ke-0 penyimpanan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05) antara perlakuan. Namun setelah disimpan selama 24 jam, viabilitas sperma

pada perlakuan P1 berbeda nyata (P<0,05) dengan keempat perlakuan lainnya, bahkan pada perlakuan P3 dan P4 semua spermanya sudah mati sejak 12 jam penyimpanan.

Salah satu penyebab penurunan viabilitas spermatozoa tersebut adalah terjadinya penurunan derajat keasaman pada kedua perlakuan tersebut hingga pH-nya menjadi 6,4 pada jam ke-12 sedangkan perlakuan lainnya

masih berkisar antara 6,7 dan 7,0. Derajat keasaman sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari normal akan membuat spermatozoa lebih cepat mati. Perubahan pH kearah yang lebih asam terjadi karena penimbunan asam laktat yang merupakan hasil metabolisme spermatozoa dalam kondisi anaerob (Daniel *et al.*, 2004), dan hal ini diperparah lagi oleh kandungan asam yang disumbangkan oleh ekstrak daun kelor yang secara nyata meningkat pada konsentrasi yang tinggi (P3 dan P4). Selain itu, rendahnya viabilitas pada perlakuan P3 dan P4 juga diduga karena dosis suplementasi ekstrak daun kelor yang sangat tinggi sehingga menyebabkan toksik dan akhirnya menimbulkan tingkat kematian yang paling tinggi. Pemunahan radikal bebas hanya dapat dilakukan apabila dosis yang diberikan tepat. Hal lainnya yang diduga menjadi penyebab hal tersebut adalah pengencer pada perlakuan P3 dan P4 lebih kental sehingga menyulitkan sperma untuk bergerak dan mempertahankan hidupnya. Pada kondisi pengencer yang demikian, sperma dapat menderita kehilangan cairan yang drastic akibat adanya pengeluaran air dari dalam sel dalam upaya untuk menjaga keseimbangan air antara intra sel dan ekstra sel.

Dari hasil studi fitokimia, daun kelor (*Moringa oleifera*) juga mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, alkaloid, phenols yang juga dapat menghambat aktivitas bakteri (Dahot, 1998). Namun senyawa alkaloid merupakan senyawa antinutrisi, sehingga jika pemberian dalam jumlah yang banyak maka fungsinya bukan untuk menghambat aktivitas bakteri melainkan akan bersifat toksik pada sel sperma.

Hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa perlakuan P1 dengan konsentrasi ekstrak daun kelor sebesar 5% lebih efektif untuk mempertahankan viabilitas sperma landrace. Hal ini menggambarkan bahwa dengan konsentrasi yang demikian, kandungan antioksidan yang terdapat di dalam ekstrak daun kelor sudah cukup optimal untuk menghambat efek negatif dari radikal bebas

yang dapat menyerang lipid pada membran plasma sperma. Prinsip kerja dari antioksidan dalam menghambat oksidasi pada lemak dapat dilihat sebagai berikut: oksigen bebas di udara akan mengoksidasi ikatan rangkap pada asam lemak yang tidak jenuh, kemudian radikal bebas yang terbentuk akan beraksi dengan oksigen sehingga akan menghasilkan peroksida aktif. Apabila dalam suatu asam lemak tidak mengandung antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan ikatan rangkap lemak. Apabila ditambah suatu antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan antioksidan tersebut sehingga pembentukan radikal bebas dapat dihentikan (Alvarez dan Storey, 1982).Selian itu, ekstrak daun kelor juga kaya akan senyawa yang mengandung gula sederhana, rhamnosa, *glucosinolates* dan *isothiocyanates* (Bennett et al, 2003).

Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan fisik dari spermatozoa (Bonet *et al.*, 1993) yang terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa dalam tubuli seminiferi maupun karena proses perjalanan spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan. Abnormalitas spermatozoa terjadi selain karena faktor heriditer juga dipengaruhi oleh faktor lain seperti penyakit yang apabila menyerang organ reproduksi akan menyebabkan gangguan pada pertumbuhan dan perkembangan organ reproduksi terutama testis yang akan menyebabkan produksi spermatozoa di dalam tubuli seminiferi tidak berlangsung secara sempurna. Abnormalitas spermatozoa yang didapatkan pada penelitian ini merupakan abnormalitas sekunder (Gambar 4), seperti ekor patah atau putus banyak ditemukan pada penelitian ini. Abnormalitas sekunder kemungkinan disebabkan karena kesalahan dalam preparasi atau ejakulasi. Salah satu abnormalitas sekunder yang terdapat di penelitian ini kebanyakan terjadi pada ekor. Abnormalitas pada ekor bisa disebabkan karena ejakulasi yang tidak sempurna dan *shock* terhadap suhu.



Gambar 4. Bentuk abnormalitas spermatozoa. Bentuk normal (N),ekor putus (AB).

Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan cara pewarnaan diferensial menggunakan cairan eosin dan diamati

dibawah mikroskop. Tabel 3 menampilkan rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa pada berbagai perlakuan.

Tabel 3. Persentase abnormalitas spermatozoa dalam pengencer dalam sitrat- kuning telur yang disuplementasi berbagai level EDK

Waktu pengamatan	P0	P1	P2	P3	P4
Awal	8,36±2,57 ^a	7,40±1,94 ^a	8,17±303 ^a	9,81±2,35 ^a	8,79±2,53 ^a
Akhir	10,73±1,43 ^a	9,50±2,72 ^a	13,02±509 ^{ab}	14,26±2,91 ^{ab}	16,10±4,26 ^b

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Pada Tabel 3, rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa pada semua perlakuan mengalami kenaikan pada akhir pengamatan. Abnormalitas spermatozoa terendah dihasilkan oleh perlakuan P1 dan tertinggi dihasilkan oleh perlakuan P4. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada awal penyimpanan tidak ada perbedaan (P>0,05) abnormalitas sperma antara perlakuan. Namun setelah disimpan selama 24 jam tingkat abnormalitas sperma pada perlakuan P1 dan P0 lebih rendah (P<0,05) daripada P4, tetapi tidak ada perbedaan (P>0,05) dengan P2 dan P3 (Tabel 3). Hal ini menggambarkan bahwa pada level rendah, ekstrak daun kelor tidak berpengaruh terhadap abnormalitas sperma. Tingginya tingkat abnormalitas sperma pada perlakuan P4 mungkin disebabkan karena konsentrasi ekstrak daun kelor yang terlalu tinggi dapat

menyebabkan pengeluaran air yang berlebihan dari dalam sel sperma yang berlanjut pada pengkerutan sel.

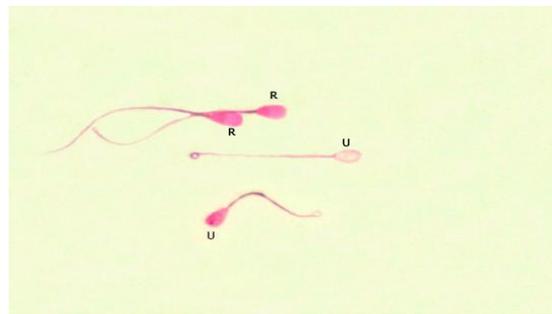
Suyadi dkk. (2012) menyatakan bahwa peningkatan angka abnormalitas disebabkan tidak hanya pada saat pembuatan preparat sebelum dilakukan pengamatan namun juga disebabkan oleh adanya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan kerusakan membran yang terjadi akibat adanya reaksi antara asam lemak tak jenuh dan juga radikal bebas. Peroksidasi lipid dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma pada bagian tengah/midpiece spermatozoa, pada bagian ini terdapat mitokondria yang terlibat dalam pembentukan energi, oksidasi asam lemak dan siklus krebs.

Pengaruh Perlakuan terhadap MPU Spermatozoa

Membran plasma utuh (MPU) mutlak harus dimiliki oleh spermatozoa supaya terjamin kelangsungan hidupnya dan tercapai keberhasilan saat proses fertilisasi. Selain berfungsi untuk melindungi organel-organel yang berada di dalam sel, membran plasma berfungsi juga untuk mengatur keluar masuknya zat-zat makanan serta keseimbangan elektrolit intra maupun ekstraseluler.

Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (MPU), setelah dipapar dengan

larutan hipoosmotik menggunakan metode *hypoosmotik swelling test* (HOS-Test) ditandai dengan ekor melingkar atau menggebu. Hal ini dapat terjadi karena medium yang masuk ke dalam sel dipertahankan oleh membran plasma yang utuh tersebut. Sebaliknya jika membran plasma sudah tidak utuh akan ditandai dengan ekor spermatozoa tetap lurus bila dipaparkan dalam larutan hipoosmotik. Hal ini terjadi karena membran plasma yang sudah tidak utuh lagi tidak dapat mempertahankan medium yang telah masuk ke dalam sel (Gambar 5.)



Gambar 5. Bentuk membran plasma yang utuh (U=ekor sperma yang melingkar) dan rusak (R=ekor sperma lurus).

Data hasil pengamatan membran plasma utuh spermatozoa babi landrace yang diencerkan dengan sitrat kuning telur dengan

penambahan suplementasi ekstrak daun kelor dalam konsentrasi berbeda disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase MPU spermatozoa dalam pengencer sitrat-kuning telur yang disuplementasi dengan berbagai level EDK

Jam pengamatan	Perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
0	81,42±2,72 ^a	83,60±1,37 ^a	83,42±3,23 ^a	76,56±4,84 ^b	74,88±3,22 ^b
4	77,20±3,04 ^a	80,33±3,58 ^a	77,61±1,45 ^a	63,06±10,7 ^b	50,96±18,9 ^b
8	74,87±1,98 ^{ab}	78,16±3,19 ^a	66,17±11,7 ^b	38,29±11,62 ^c	32,14±4,52 ^c
12	71,28±0,67 ^a	75,86±2,93 ^a	38,48±27,7 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c
16	62,84±8,20 ^a	72,74±3,42 ^a	21,60±31,6 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c
20	52,16±19,96 ^a	71,33±2,77 ^a	13,99±31,2 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b
24	28,95±28,57 ^b	48,75±30,58 ^a	11,85±26,5 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b

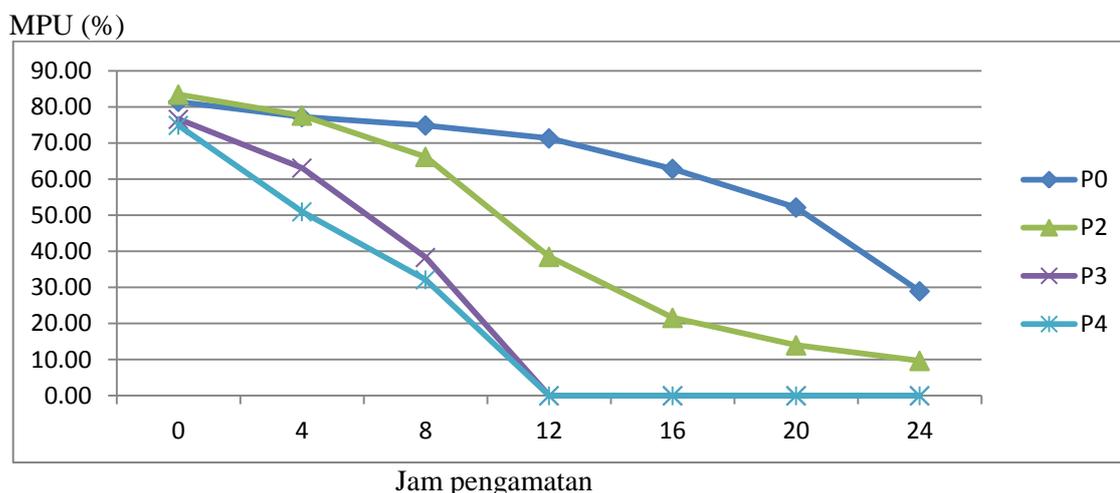
Superskrip yang berbeda dalam baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Data pada Tabel 4 menunjukkan bahwa secara empiris perlakuan P1 menghasilkan sperma dengan persentase MPU tertinggi dan

terendah pada perlakuan P4. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada awal penyimpanan tidak ada perbedaan MPU

($P > 0,05$) antara perlakuan P1, P0 dan P2, namun ketiga perlakuan tersebut berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan P3 dan P4. Pada jam ke-24 penyimpanan, perlakuan P1 berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan P1, P2, P3 dan P4. Hal ini menggambarkan bahwa persentase 5%

ekstrak daun kelor lebih optimal dalam melindungi membran plasma sperma daripada persentase ekstrak daun kelor yang lebih tinggi. Penurunan persentase MPU dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Pola penurunan persentase MPU spermatozoa babi

Tingginya persentase MPU spermatozoa pada perlakuan penambahan EDK 5% dalam pengencer sitrat kuning telur menunjukkan keefektifannya dalam menghambat terjadinya peroksidasi lipid pada membran spermatozoa. Kasolo *et al.* (2010) menyatakan bahwa daun kelor mengandung antioksidan yang memiliki kekuatan 7 kali lebih banyak dari vitamin C. Vitamin C merupakan salah satu vitamin yang bersifat sebagai antioksidan larut dalam lemak yang mampu menghambat aktivitas senyawa oksigen reaktif dan mencegah terjadinya reaksi berantai antara senyawa oksigen reaktif dengan asam lemak tak jenuh majemuk yang terdapat pada membran plasma spermatozoa. Vitamin C juga mampu bekerja di dalam dan di luar dinding sel sehingga dapat mengurangi atau mencegah peroksidasi lipid secara lebih luas (Aitken *et al.*, 1993).

Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme dan berhubungan dengan motilitas serta daya hidup spermatozoa yang

dihasilkan. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Selama proses pematangan spermatozoa di dalam epididimis, juga terjadi perubahan susunan komponen senyawa-senyawa penyusun membran plasma sel spermatozoa. Membran plasma sel spermatozoa akan kehilangan sebagian kolesterol, sehingga terjadi peningkatan nisbah antara asam lemak tak jenuh dan kolesterol. Hal ini menyebabkan membran plasma menjadi lebih rapuh. Kondisi membran plasma yang demikian ini secara fisiologis memang dibutuhkan untuk memudahkan spermatozoa menjalani proses kapasitasasi di dalam uterus dan pada waktu fusi dengan membran plasma oosit saat terjadi fertilisasi, namun jika hal tersebut terjadi selama penyimpanan sperma maka akan berdampak negatif terhadap kemampuan fertilisasi sperma.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diberikan kesimpulan sebagai berikut :

- a. Ekstrak daun kelor yang ditambahkan dalam pengencer sitrat-kuning telur efektif untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas, namun tidak berpengaruh terhadap abnormalitas dan membran plasma utuh spermatozoa babi landrace yang disimpan pada suhu 18-20°C.
- b. Level terbaik ekstrak daun kelor yang digunakan dalam pengencer sitrat-kuning telur, adalah 5%
- c. Semen cair babi landrace yang diencerkan dengan sitrat-kuning telur dan disuplementasi dengan 5% ekstrak daun kelor dapat bertahan selama 24 jam dalam *stirofoam* bersuhu 18-20°C dengan motilitas spermatozoa di atas 40.00%.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulphate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.
- Aitken R, Harkiss JD, Buckingham DW. 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 35:302-315.
- Alvarez JG, Storey BT. 1982. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa : its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* 27:110-21108.
- Bennett R, Mellon F, Pratt J, Dupont M, Pernins L, Kroon P 2003. Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. (horseradish tree) and *Moringa stenopetal* L. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3546-5553.
- Bonet S, Briz M, Fradera A. 1993. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. *Theriogenology* 63:383-396.
- Dahot MU. 1998. Antimicrobial activity of Small Protein of *Moringa oleifera* leaves. *J Islam Acad Sci* 11(1): 27-32.
- Daniel LS, Regina M, Botting, Timothy H., 2004. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 56: 387-437.
- Fuglie L. 2001. The Miracle Tree : The Multiple Attributes of *Moringa*, Dakar.
- Hammerstedt RH. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: A review of the effects on design and storage preservation system. *Reprod. Fert.Div.* 5:675-690.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *J Anim Sci* 62:143-172.
- Kasolo JN, Bimeya GS, Ojok L, Ochieng J, Okwal-okeng JW. 2010. Phytochemicals and uses of moringa oleifera leaves in ugandan rural communities. *Journal of Medical Plant Research* 4(9):753-757.
- Kostaman T, Utama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing boer pada pengencer tris sitrat-fruktosa. *J Sain Vet.* 24(1): 58-64.
- Kurniasih. 2013. Khasiat dan Manfaat Daun Kelor Untuk Penyembuhan Berbagai Penyakit. Yogyakarta: Pustaka Baru Press.
- Nalley WM, Arifiantini I. 2011. The Viability of Local Ram Semen in Tris Buffer With Three Different Egg Yolks. *Animal Production* 13(1): 39-44.
- Rizal M, Herdis, Boediono A. 2004. Daya hidup sperma epididimis domba setelah disimpan pada suhu rendah (5°C). *J. Anim. Prod.* 6(1):30-36.
- Rizal M, Herdis. 2010. Peran antioksidan dalam meningkatkan kualitas semen beku. *Wartazoa* 20(3):139-145.
- Shui G, Wong SP, Leong LP. 2004. Characterization of antioxidants and change of antioxidant levels during storage of *Manilkara zapota* L. *Agric Food Chem.* 52:7834-7841.
- Suyadi A, Rachmawati, Iswanto N. 2012. Pengaruh α -tocopherol yang berbeda

dalam pengencer dasar tris aminomethane-kuning telur terhadap kualitas semen kambing boer yang disimpan pada suhu 5^oc. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan* 22(3):1-8.

Tamoes JA, Nalley WM, Hine TM. 2014. Fertilitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer modifikasi zorlesco dengan susu kacang kedelai. *J Sains Peternakan* 12(1): 20-30.