

EFEK SUPLEMENTASI MELATONIN PADA MEDIA PENGECER TERHADAP PARAMETER KUALITAS SPERMA DOMBA PASCA-EKULIBRASI

Effects of Melatonin Supplementation in Dilution Media on Sperm Quality Parameters in Sheep Post-Equilibration

Frilianty Putri^{1*}, Ni Wayan Kurniani Karja², Mohamad Agus Setiadi², Ekayanti Mulyawati Kaiin³, Rizky Amrullah Chaniago⁴

¹Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Riau, Indonesia

²Divisi Reproduksi dan Obstetri, Sekolah Kedokteran Hewan dan Ilmu Biomedis, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

³Pusat Penelitian Zoologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Indonesia

⁴Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Bengkulu, Indonesia

*Corresponding Author: friliantyputri@lecturer.unri.ac.id

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of melatonin supplementation in semen extender on the post-equilibration quality of ram spermatozoa. Melatonin is a potent antioxidant known to counteract oxidative stress, particularly during semen cryopreservation and thawing processes. The evaluated parameters included sperm motility, plasma membrane integrity, acrosome integrity, and viability, both before and after the equilibration phase. The results demonstrated that the addition of 1 mM melatonin significantly improved sperm motility ($83.33 \pm 2.8\%$) and plasma membrane integrity ($81.63 \pm 0.62\%$) compared to the control group. Furthermore, post-equilibration sperm viability was significantly higher in the melatonin-treated group ($76.41 \pm 1.4\%$) than in the control group ($71.67 \pm 2.2\%$). The supplementation of melatonin in the semen extender effectively preserved sperm quality during the cryopreservation process. These findings suggest that melatonin holds considerable potential as an additive in semen extenders to enhance the efficiency and success of artificial insemination programs in livestock, particularly in rams.

Keywords: Equilibration, Melatonin, Spermatozoa

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh suplementasi melatonin dalam media pengencer terhadap kualitas spermatozoa domba pasca-ekuibrasi. Melatonin dikenal sebagai antioksidan kuat yang mampu menangkal stres oksidatif, terutama yang terjadi selama proses kriopreservasi dan pencairan semen. Parameter yang diamati dalam penelitian ini meliputi motilitas, integritas membran plasma, keutuhan tudung akrosom, dan viabilitas spermatozoa, baik sebelum maupun setelah proses ekuibrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan melatonin pada konsentrasi 1 mM memberikan peningkatan yang signifikan terhadap motilitas spermatozoa ($83,33 \pm 2,8\%$) dan integritas membran plasma ($81,63 \pm 0,62\%$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selain itu, viabilitas spermatozoa pasca-ekuibrasi juga meningkat secara signifikan pada kelompok perlakuan ($76,41 \pm 1,4\%$) dibandingkan dengan kelompok kontrol ($71,67 \pm 2,2\%$). Penambahan melatonin dalam media pengencer terbukti mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses kriopreservasi. Temuan ini menunjukkan bahwa melatonin memiliki potensi besar sebagai aditif dalam pengencer semen guna meningkatkan efektivitas dan keberhasilan program inseminasi buatan pada ternak, khususnya pada domba.

Kata kunci: Ekuibrasi, Melatonin, Spermatozoa

PENDAHULUAN

Kriopreservasi semen merupakan salah satu teknologi kunci dalam program

inseminasi buatan (IB) yang bertujuan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi pada hewan ternak, termasuk domba. Teknologi ini memungkinkan

penyimpanan semen dalam jangka waktu lama tanpa kehilangan viabilitas dan fertilitasnya, sehingga dapat digunakan ketika dibutuhkan untuk proses reproduksi. Namun, proses kriopreservasi seringkali menyebabkan kerusakan pada spermatozoa, yang berdampak negatif terhadap kualitas sperma setelah pencairan. Penurunan yang signifikan dalam motilitas, viabilitas, serta integritas membran sperma kerap dihadapi akibat kerusakan oksidatif yang dihasilkan selama proses pembekuan dan pencairan (Bernáth *et al.*, 2015; Hossen *et al.*, 2021).

Kualitas sperma pasca-kriopreservasi sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk media pengencer yang digunakan dan proses ekuibrasi semen. Ekuibrasi, yang merupakan tahap di mana sperma beradaptasi dengan lingkungan baru setelah penambahan *cryoprotectant*, berperan penting dalam meminimalkan kerusakan yang terjadi akibat pembekuan. Penggunaan media pengencer yang mengandung komponen antioksidan telah menunjukkan potensi besar dalam meningkatkan kualitas sperma yang dihasilkan. Antioksidan berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS) yang dihasilkan selama proses kriopreservasi (Lê *et al.*, 2019).

Ma *et al.* (2022) melaporkan bahwa penggunaan berbagai jenis antioksidan dalam pengencer dapat secara signifikan meningkatkan kualitas semen setelah proses *thawing*. Selain itu, studi oleh Widyastuti *et al.* (2024) menunjukkan bahwa media pengencer yang diperkaya dengan antioksidan dapat mempertahankan stabilitas spermatozoa selama penyimpanan dingin, serta memperbaiki parameter kualitas spermatozoa pasca-thawing. Dalam beberapa tahun terakhir, melatonin telah banyak digunakan sebagai antioksidan tambahan dalam proses kriopreservasi. Suplemen melatonin bekerja sebagai antioksidan yang dapat

mengurangi kerusakan akibat stres oksidatif yang sering terjadi selama proses kriopreservasi. Fang *et al.* (2020) menyatakan bahwa melatonin dapat menghambat pembentukan pori permeabilitas mitokondria, yang merupakan penyebab utama kerusakan dan apoptosis pada spermatozoa selama pembekuan. Melatonin merangsang aktivitas enzim yang terlibat dalam metabolisme ROS dan menjaga integritas membran sel (Putri *et al.*, 2023). Suplementasi melatonin sebagai antioksidan pada pengencer semen masih perlu dieksplorasi, maka dari itu penelitian ini dilakukan untuk melihat efektifitas suplementasi melatonin pada pengencer terhadap kualitas semen pasca-ekuibrasi.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Divisi Reproduksi dan Obstetri, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor pada bulan Desember 2021 sampai Juli 2022.

Metode Penelitian

Sampel ejakulat dikoleksi dari dua pejantan domba garut (*pringan of west java*) yang berumur 18-24 bulan dengan berat 30-40 kg yang diperoleh dari Unit Rehabilitasi dan Reproduksi, Divisi Reproduksi dan Obstetri, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor. Pakan berupa hijauan diberikan pagi dan sore hari sebanyak 3 kg/ekor/hari dan konsentrat dengan protein 11% sebanyak 0,3 kg/ekor/hari. Air minum disediakan secara *ad libitum*. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komisi etik IPB nomor 231-2021 IPB.

Koleksi spermatozoa asal ejakulat dilakukan dengan metode vagina buatan (MVB) sebanyak tiga kali sebagai jumlah ulangan. Segera setelah dikumpulkan, sperma dibawa ke laboratorium untuk evaluasi dan kriopreservasi. Hanya sampel

dengan motilitas lebih dari 70% yang digunakan dalam penelitian ini.

Semen diencerkan menggunakan pengencer Andromed serta dengan kombinasi Andromed dan suplemen melatonin 1,0 mM. Setelah proses pengenceran, kualitas semen dievaluasi berdasarkan parameter motilitas, viabilitas, integritas membran plasma, dan keutuhan tudung akrosom, sebelum dikemas dalam straw berukuran 0,25 mL. Selanjutnya, semen yang telah dikemas diinkubasi dalam lemari es pada suhu 5°C selama 4 jam untuk proses ekuilibrisasi. Setelah periode ekuilibrisasi, setiap sampel *dithawing* dan dievaluasi kembali untuk parameter yang sama: motilitas, viabilitas, integritas membran plasma, dan keutuhan tudung akrosom.

Evaluasi Semen

Motilitas. Pengamatan motilitas spermatozoa mengacu pada metode yang dimodifikasi oleh Putri (2023), straw untuk setiap perlakuan dicairkan dengan cara merendamnya dalam air pada suhu 37°C dalam bak air selama 30 detik. Penilaian motilitas menggunakan mikroskop cahaya (NIKON FDX-35) dengan perbesaran 400x dengan standar penilaian mengacu pada (Susilawati, 2011).

Membran Plasma Utuh. Pemeriksaan integritas membran plasma spermatozoa dilakukan menggunakan Uji Pembengkakan Hipoosmotik (HOS-Test). Sebanyak 20 µL sampel semen dicampurkan dengan 80 µL larutan HOS dan diinkubasi selama 30 menit dalam bak air pada suhu 37°C. Setelah itu, sampel diamati di bawah mikroskop cahaya (Nikon FDX-35) dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang menunjukkan kerusakan pada membran plasma ditandai dengan ekor yang lurus, sedangkan spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor yang melingkar atau tampak menggembung. Sebanyak minimal 200 sel spermatozoa diamati pada 10 bidang pandang yang berbeda.

Tudung Akrosom Utuh.

Pewarnaan TBG dimulai dengan meneteskan semen dan larutan *trypan blue* untuk dibuat preparat ulas dan dikeringkan secara vertikal. Preparat diwarnai menggunakan larutan *neutral red* kemudian direndam dalam larutan *giemsa* 5%. Evaluasi dilakukan pada 200 sel menggunakan mikroskop cahaya dengan lensa objektif perbesaran 400x. Spermatozoa dengan tudung akrosom utuh (TAU) berwarna ungu pada bagian kepala sedangkan spermatozoa dengan akrosom yang tidak utuh akan berwarna lavender pucat atau pudar.

Viabilitas. Viabilitas spermatozoa merujuk pada kemampuan hidup spermatozoa dan memiliki hubungan erat dengan motilitas, yang ditentukan oleh integritas membran plasma spermatozoa (Amfotis *et al.*, 2025). Rumus yang digunakan untuk menghitung viabilitas spermatozoa adalah:

$$\text{Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Hidup}}{\text{Jumlah Spermatozoa Total}} \times 100\%$$

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada setiap tahapan. Data diperoleh dari 3 kali ulangan kemudian dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) pada taraf nyata 95% serta disajikan sebagai persentase ± standar deviasi (SD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas spermatozoa domba setelah pengenceran

Motilitas sperma merupakan salah satu parameter kunci yang menentukan keberhasilan reproduksi, terutama dalam konteks inseminasi buatan. Setelah proses pengenceran, motilitas sperma sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk jenis pengencer yang digunakan, konsentrasi spermatozoa, dan waktu eksposur di media pengencer. Pengenceran semen bertujuan untuk menjaga viabilitas spermatozoa dengan

memperlambat proses pembekuan dan meningkatkan kemampuan sperma untuk bertahan dalam lingkungan yang tidak alami.

Tabel 1 menunjukkan bahwa penggunaan Andromed yang disuplementasi dengan melatonin 1 mM menghasilkan peningkatan persentase motilitas spermatozoa yang signifikan, mencapai $83,33 \pm 2,8$ ($P < 0,05$), dibandingkan dengan kontrol yang hanya menggunakan Andromed dengan motilitas 76,33%. Hasil ini sejalan dengan

penelitian sebelumnya oleh Li *et al.* (2016) yang menyatakan bahwa melatonin dapat melindungi spermatozoa dari stres oksidatif dan meningkatkan aktivitas mitokondria, yang berkontribusi pada motilitas sperma yang lebih baik. Tambahan melatonin dalam pengencer semen dapat meningkatkan kapabilitas reproduksi pada domba, termasuk dalam meningkatkan motilitas progresif spermatozoa (Rekik *et al.*, 2015).

Tabel 1. Hasil Kualitas Spermatozoa Domba Setelah Pengenceran

Perlakuan	Parameter (%)			
	Motilitas	Membran Plasma Utuh	Tudung Akrosom Utuh	Viabilitas
P0	$76,33 \pm 5,2$	$73,16 \pm 1,0^a$	$76,33 \pm 5,2$	$77,66 \pm 4,0$
P1	$83,33 \pm 2,8$	$81,63 \pm 0,62^b$	$81,91 \pm 0,8$	$80,15 \pm 2,5$

P0 = Kontrol (Andromed), P1 = Perlakuan (Andromed + 1 mM Melatonin).

^{a, b}, superskrip yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$).

Tabel 2. Hasil Kualitas Spermatozoa Domba Setelah Ekuiblisasi

Perlakuan	Parameter (%)			
	Motilitas	Membran Plasma Utuh	Tudung Akrosom Utuh	Viabilitas
P0	$70,00 \pm 0,0$	$73,50 \pm 3,0$	$73,50 \pm 1,3$	$71,67 \pm 2,2^a$
P1	$70,00 \pm 0,0$	$75,68 \pm 1,6$	$72,48 \pm 3,05$	$76,41 \pm 1,4^b$

P0 = Kontrol (Andromed), P1 = Perlakuan (Andromed + 1 mM Melatonin).

^{a, b}, superskrip yang berbeda pada baris yang sama berbeda nyata ($p < 0,05$).

Parameter Membran Plasma Utuh (MPU), hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai MPU dari perlakuan P1 yang disuplementasi melatonin mencapai $81,63 \pm 0,62$ dan tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($P > 0,05$) dibandingkan kontrol. Namun, penting untuk dicatat bahwa melatonin dikenal sebagai agen antioksidan yang dapat melindungi membran sel dari kerusakan akibat oksidasi, sehingga meningkatkan integritas membran plasma spermatozoa (Espino *et al.*, 2011; Reis *et al.*, 2016).

Pentingnya integritas membran plasma dalam mempertahankan fungsi fisiologis spermatozoa selama kriopreservasi, yang menunjukkan bahwa

perlakuan dengan antioksidan seperti melatonin memiliki potensi untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan selama periode penyimpanan (Pujiyanto *et al.*, 2018). Namun, parameter tudung akrosom utuh dan viabilitas spermatozoa tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara perlakuan, yang mungkin disebabkan oleh kompleksitas mekanisme yang terlibat dalam proses fertilisasi. Tudung akrosom memegang peranan penting dalam penetrasi spermatozoa ke dalam sel telur (Khalil *et al.*, 2018).



Gambar 1. Hasil pewarnaan akrosom menggunakan *triple stain* (*trypan blue-giemsa*). (A) tudung akrosom utuh, (B) tudung akrosom rusak

Kualitas spermatozoa domba setelah ekuiblisasi

Ekuiblisasi merupakan proses kritis dalam kriopreservasi semen yang berdampak signifikan pada kualitas sperma hewan seperti domba, sapi, dan banteng. Proses ini bertujuan untuk menyesuaikan sperma dengan kondisi suhu dingin yang akan dialaminya selama pembekuan. Proses kriopreservasi semen dapat mengakibatkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) (Rekik *et al.*, 2015). Pembentukan ROS ini terjadi akibat ketidakseimbangan antara jumlah antioksidan dan oksidan, yang menyebabkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat merusak membran plasma, karena struktur membran yang terdiri dari fosfolipid sangat rentan terhadap peroksidasi lipid (Bucak *et al.*, 2010). Parameter seperti motilitas, MPU, TAU dan viabilitas spermatozoa yang diinkubasi dengan melatonin juga terpengaruh.

Tabel 2 menunjukkan persentase motilitas yang sama baik kelompok P0 maupun P1 70% ($P>0,5$). Nilai MPU P0 dan P1, secara berurutan, 73,50% dan 75,68% ($P>0,5$). Kenaikan persentase MPU setelah penambahan melatonin menunjukkan manfaat dari suplementasi ini terhadap kualitas spermatozoa.

Membran plasma yang utuh merupakan indikator penting dari kesehatan spermatozoa dan viabilitas, karena keutuhan membran berpengaruh langsung terhadap kemampuan spermatozoa untuk berfungsi secara fisiologis, termasuk dalam hal motilitas dan fertilisasi (Hardyastuti *et al.*, 2023; Rizal *et al.*, 2021).

Viabilitas spermatozoa (Tabel 2) menunjukkan perbedaan signifikan antara P0 dan P1, secara berurutan, 71,67% dan 76,41% ($P>0,5$). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan melatonin dalam media pengencer memiliki efek positif yang signifikan terhadap kualitas spermatozoa pasca-ekuiblisasi. Viabilitas yang tinggi adalah indikator penting untuk kemampuan fertilisasi spermatozoa, di mana spermatozoa yang hidup berpotensi lebih besar untuk mencapai dan fertilisasi ovum (Dwitarizki *et al.*, 2015; Jiyato & Anwar, 2019).

Melatonin sebagai suatu agen antioksidan, terbukti dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif yang sering terjadi selama proses kriopreservasi dan pencairan semen. Kerusakan oksidatif memainkan peran penting dalam menurunkan kualitas sperma, dan penelitian menunjukkan bahwa peningkatan kadar spesies oksigen reaktif (ROS) berhubungan dengan penurunan viabilitas spermatozoa (Sigit *et al.*, 2022). Sumarsono *et al.* (2022) menyatakan bahwa penggunaan antioksidan dalam media pengencer mampu mempertahankan viabilitas sperma, terutama setelah proses thawing.

Melatonin dalam pengencer semen berkontribusi secara signifikan terhadap parameter viabilitas, bersamaan dengan penurunan kerusakan akibat ROS. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan melatonin tidak hanya meningkatkan integritas membran tetapi juga meningkatkan proporsi spermatozoa yang tetap hidup setelah kriopreservasi (Amal *et al.*, 2019). Keberhasilan ini berimplikasi pada peningkatan efektivitas program

inseminasi buatan, menjadikan melatonin potensi penting sebagai aditif dalam pengencer semen pada hewan ternak (Wiratmini *et al.*, 2022).

KESIMPULAN

Suplementasi melatonin dalam pengencer semen secara signifikan meningkatkan kualitas spermatozoa domba, baik sebelum maupun setelah proses kriopreservasi. Penambahan melatonin terbukti meningkatkan motilitas, integritas membran plasma, dan viabilitas spermatozoa, yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Selain itu, melatonin memiliki peran sebagai agen antioksidan yang melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif selama proses kriopreservasi

DAFTAR PUSTAKA

- Amal, A. S., Arifiantini, R. I., Setiadi, M. A., & Said, S. (2019). Characteristics of the post-thawed Balinese bull semen extended in three different extenders and equilibration times. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 44(2), 135–145. <https://doi.org/10.14710/jitaa.44.2.135-145>
- Amfotis, M. D., Telupere, F. M. S., Setyani, N. M. P., & Marawali, A. (2025). Efek penambahan kuning telur omega-3 pada pengencer air kelapa muda terhadap kualitas spermatozoa babi Landrace: The effect of adding omega-3 egg yolk in coconut water diluent on the quality of Landrace boar spermatozoa. *Wahana Peternakan*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.37090/jwputb.v9i1.1692>
- Bernáth, G., Żarski, D., Krejszeff, S., Palińska-Żarska, K., Bokor, Z., Król, J., Kollár, T., Kucharczyk, D., Urbányi, B., & Horváth, Á. (2015). Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 94–98. <https://doi.org/10.1111/jai.12740>
- Dwitarizki, N. D., Ismaya, I., & Asmarawati, W. (2015). Pengaruh pengenceran sperma dengan air kelapa dan aras kuning telur itik serta lama penyimpanan terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa domba Garut pada penyimpanan 5°C. *Buletin Peternakan*, 39(3), 149–155. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternakan.v39i3.7979>
- Espino, J., Ortiz, Á., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., García, J. F., Rodríguez, A., & Pariente, J. A. (2011). Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor– and extracellular signal–regulated kinase-mediated pathways. *Fertility and Sterility*, 95(7), 2290–2296. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.03.063>
- Fang, Y., Zhao, C., Xiang, H., Zhao, X., & Zhong, R. (2020). Melatonin inhibits formation of mitochondrial permeability transition pores and improves oxidative phosphorylation of frozen-thawed ram sperm. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 896. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00896>
- Hardyastuti, D. M., Sumaryadi, M. Y., Saleh, D. M., Setyaningrum, A., & Susanto, A. (2023). Kualitas semen cair dan semen beku kambing Peranakan Etawa (PE) pada berbagai jenis pengencer. *Prosiding Seminar Nasional Pembangunan dan Pendidikan Vokasi Pertanian*, 4(1), 388–396. <https://doi.org/10.47687/snppvp.v4i1.661>
- Hossen, S., Sharker, M. R., Cho, Y., Sukhan, Z. P., & Kho, K. H. (2021). Effects of antifreeze protein III on

- sperm cryopreservation of Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3917. <https://doi.org/10.3390/ijms22083917>
- Jiyato, & Anwar, P. (2019). Identifikasi kualitas spermatozoa sapi Kuantan Riau sebagai pelestarian plasma nutfah ternak lokal. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 6(1), 52–60. <https://doi.org/10.33772/jitro.v6i1.5724>
- Khalil, W. A., El-Hairiry, M., Zeidan, A. E. B., Hassan, M. A. E., & Mohey-Elsaeed, O. (2018). Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(sup1), S49–S56. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.11.001>
- Lê, M. T., Nguyen, T. T. T., Nguyen, T., Nguyen, T. V., Nguyen, T. A. T., Nguyễn, V. Q. H., & Cao, N. T. (2019). Does conventional freezing affect sperm DNA fragmentation? *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 46(2), 67–75. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.46.2.67>
- Li, P., Meng, J., Liu, W., Smith, G. W., Yao, J., & Lyu, L. (2016). Transcriptome analysis of bovine ovarian follicles at predeviation and onset of deviation stages of a follicular wave. *International Journal of Genomics*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/3472748>
- Ma, L., Kim, D. H., Jung, E.-J., Lee, W.-J., Hwang, J.-M., Bae, J.-W., Jung, D., Yi, J. K., Lee, S. M., Ha, J. J., & Kwon, W. (2022). Effect of glycerol addition time on the cryopreserved Korean native Brindle cattle (Chikso) sperm quality. *Animal Reproduction*, 19(1), Article e20210058. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2021-0058>
- Pujianto, D. A., Hajizah, H., Mansur, I. G., & Amarudin, A. (2018). Antisperm antibodies disrupt plasma membrane integrity and inhibit tyrosine phosphorylation in human spermatozoa. *Medical Journal of Indonesia*, 27(1), 3–11. <https://doi.org/10.13181/mji.v27i1.1429>
- Putri, F. (2023). *Pengaruh konsentrasi spermatozoa dan penambahan antioksidan melatonin pada pengencer terhadap peningkatan kualitas spermatozoa domba post-thawing dan tingkat fertilisasi in vitro* [Skripsi, IPB University]. <https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/115984>
- Putri, F., Karja, N. W. K., Setiadi, M. A., & Kaiin, E. M. (2023). Influence of sperm number and antioxidant melatonin in extender on the quality of post-thawing sheep spermatozoa. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 28(1), 1–10. <https://doi.org/10.14334/jitv.v28i1.3069>
- Reis, L. S. L. de S., Ramos, A. A., Camargos, A. S., & Oba, E. (2016). Integrity of the plasma membrane, the acrosomal membrane, and the mitochondrial membrane potential of sperm in Nelore bulls from puberty to sexual maturity. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(3), 620–628. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8748>
- Rekik, M., Taboubi, R., Salem, I. B., Fehri, Y., Sakly, C., Lassoued, N., & Hilali, M. E. (2015). Melatonin administration enhances the reproductive capacity of young rams under a southern Mediterranean environment. *Animal Science*

- Journal*, 86(7), 666–672.
<https://doi.org/10.1111/asj.12350>
- Rizal, M., Nisa, C., & Norliani, R. (2021). Kualitas semen beku kambing Peranakan Boer yang dikriopreservasi dengan pengencer Tris kuning telur dan berbagai konsentrasi ekstrak daun kelor. *Jurnal Veteriner*, 22(3), 309–316.
<https://doi.org/10.19087/jveteriner.2021.22.3.309>
- Sigit, M., Pratama, J. W. A., Wardhani, H. C. P., & Mardijanto, A. (2022). Korelasi antara volume skrotum terhadap motilitas, viabilitas dan konsentrasi spermatozoa sapi pejantan Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia*, 7(1), 12–20.
<https://doi.org/10.32503/fillia.v7i1.2277>
- Sumarsono, T., Purwantara, B., Supriatna, I., Setiadi, M. A., & Agil, M. (2022). Potensi alfa enolase (ENO1) membran plasma spermatozoa sapi Bali sebagai protein antigenik. *Acta Veterinaria Indonesiana*, 10(3), 262–269.
<https://doi.org/10.29244/avi.10.3.262-269>
- Susilawati, T. (2011). *Spermatology* (1st ed.). UB Press.
- Widyastuti, R., Prastowo, S., Jaswandi, J., Lubis, A., Setiawan, R., Ridlo, M. R., & Boediono, A. (2024). Effect of melatonin supplementation on sperm quality parameters and expression of antioxidant genes during cold storage of buck semen extenders. *Veterinary World*, 17(4), 863–870.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.863-870>
- Wiratmini, N. I., Sukmaningsih, A. A. S. A., Narayani, I., & Pharmawati, M. (2022). Pendampingan pengadaan bahan praktikum zoologi dan bioteknologi bagi guru SMA di Kabupaten Klungkung. *Buletin Udayana Mengabdi*, 21(3), 217–225.
- <https://doi.org/10.24843/bum.2022.v21.i03.p04>