

PENGARUH WAKTU PRA PEMBEKUAN TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU DALAM PENGENCER SPERMAX

(The Effect of Pre-Freezing Time on The Quality of Frozen Semen of Landrace Boars in Spermax Diluent)

Theresia A. A. T. Dui*, W. M. Nalley, A. Bire Lawa, F. M. S. Telupere, T. M. Hine, Ni Made P. Setyani

Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Kelautan, dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana
Jln. Adisucipto, Penfui, Kupang, Nusa Tenggara Timur, Indonesia 850001

*Correspondent author, email: tecydui@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh waktu pra pembekuan terhadap kualitas semen beku. Semen ditampung dari 4 pejantan yang berumur 2-3 tahun. Semen dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis, dan selanjutnya semen yang berkualitas baik diencerkan dalam pengencer dasar, kemudian dilakukan *holding time* selama 2 jam pada suhu 27-28°C. Semen kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 rpm selama 15 menit, pelet spermatozoa diencerkan kembali dengan pengencer spermax, dikemas dalam straw 0,5 mL, dan diekuilibrasikan selama 2 jam pada suhu 3-5°C. Setelah ekuilibrasikan, straw dibekukan dengan meletakkannya 10 cm di atas permukaan nitrogen cair pada suhu ±-110°C dengan durasi 3, 6, 9, dan 12 menit. Straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair pada suhu -196°C. Thawing dilakukan dengan cara straw dicemplung ke dalam *waterbath* yang berisi air pada suhu 37°C selama 30 detik dan selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama waktu pra pembekuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap kualitas semen pasca pengenceran dan ekuilibrasikan, namun berpengaruh nyata ($P<0,01$) terhadap *recovery rate*, motilitas, dan viabilitas spermatozoa pasca thawing, dengan perlakuan terbaik adalah 9 menit. Disimpulkan bahwa waktu pra pembekuan selama 9 menit menghasilkan kualitas semen beku tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya.

Kata-kata kunci: Babi Landrace, semen, waktu pra pembekuan

ABSTRACT

This research aimed to investigate the effect of pre-freezing time on the quality of frozen Landrace boar semen. Semen was collected from four 2-3 year old Landrace boars. The semen was evaluated macroscopically and microscopically. Subsequently, good quality semen was diluted in a basic extender, then subjected to a holding time of 2 hours at 27-28°C. The semen was then centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes. The spermatozoa pellet was re-diluted with a Spermax extender, packaged into 0.5 mL straws, and equilibrated for 2 hours at 3-5°C. After equilibration, the straws were frozen by placing them 10 cm above the surface of liquid nitrogen at ±-110°C for durations of 3, 6, 9, and 12 minutes. The straws were then immersed into liquid nitrogen at -196°C. Thawing was performed by immersing the straws into a water bath containing water at 37°C for 30 seconds, followed by evaluation of semen quality. The results showed that pre-freezing time had no significant effect ($P>0.05$) on semen quality after dilution and equilibration. However, it had a significant effect ($P<0.01$) on the recovery rate, motility, and viability of spermatozoa after thawing, with the best treatment being 9 minutes. It was concluded that a pre-freezing time of 9 minutes resulted in the highest quality of frozen Landrace boar semen compared to other treatments.

Keywords: Landrace Boar, semen, pre-freezing time

PENDAHULUAN

Pembekuan semen sangat esensial dalam industri ternak babi karena memungkinkan perolehan bibit unggul dan peningkatan produksi daging babi. Spermatozoa babi memiliki karakteristik unik pada lapisan luarnya, karena kadar fosfolipid utama membran sel yang tinggi (masing-masing 24% dan 14%), spermatozoa menjadi lebih rentan terhadap *cold shock* ketika diawetkan dan dibekukan. Foeh *et al.* (2016) mengusulkan perlunya waktu tunggu pada suhu kamar (20-22°C) untuk memungkinkan spermatozoa menyesuaikan diri sebelum proses pengawetan dan pembekuan dilakukan, sehingga mengurangi dampak *cold shock*. Lebih lanjut, Os *et al.* (2013) menekankan kualitas semen beku sangat bergantung pada metode pembekuan yang akurat, jenis dan dosis krioprotektan yang dimasukkan, serta komposisi bahan pengencer yang dipakai.

Pengenceran memegang peranan krusial dalam mempertahankan kualitas vitalitas dan kemampuan membuahi spermatozoa selama proses penyimpanan dalam suhu dingin, dan memiliki kemampuan untuk mempertahankan kualitas spermatozoa. Spermax merupakan pengencer yang baik, memiliki komposisi sebagai sumber energi untuk spermatozoa berupa glukosa, natrium bikarbonat, pelindung, dan eksipien membran spektrum tinggi. Selain itu, lipoprotein dan lesitin memegang peranan penting dalam melindungi membran sel spermatozoa dari kerusakan akibat suhu dingin (*cold shock*) selama penyimpanan. Pengencer spermax memiliki komposisi berupa antioksidan eksklusif dan prekursor energi yang menjaga spermatozoa pada vitalitas maksimalnya pada saat pertumbuhan dan melindungi selama

penyimpanan Ngongo *et al.* (2024), namun pengencer ini hanya dapat berperan saat preservasi, oleh karena itu dalam program pembuatan semen beku perlu ditambahkan krioprotektan. Gliserol merupakan krioprotektan yang umum digunakan, seperti yang dijelaskan oleh Dongkot *et al.* (2022). Mereka menyatakan bahwa gliserol melindungi spermatozoa dari kerusakan dengan cara masuk ke dalam sel, menggantikan air, dan menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler. Kendati demikian, penggunaan gliserol dalam jumlah berlebihan saat pembekuan semen sapi Brahman diduga dapat mengganggu konsentrasi dan osmolaritas larutan Setiono *et al.* (2015). Proses pembekuan semen memiliki tahapan pengenceran, ekuilibrasi, pra pembekuan, dan pembekuan (Marlize *et al.*, 2021)

Tahap pra pembekuan adalah proses penurunan suhu semen hingga mencapai titik beku yang diinginkan dan berpengaruh signifikan terhadap mutu semen beku, termasuk pergerakan dan daya hidup sperma Rangkuti *et al.* (2021). Permasalahan umum yang menurunkan kualitas semen sering terjadi selama pemrosesan, terutama pada tahap pembekuan. Pembekuan semen dapat memicu *cold shock* dan perubahan di dalam sel akibat pembentukan kristal es. Pratiwi *et al.* (2014) melaporkan bahwa pembekuan dapat menurunkan kualitas semen sekitar 10-40%. Tingkat pendinginan menjadi aspek krusial dalam proses pembekuan semen. Rangkuti *et al.* (2021) menjelaskan bahwa proses pembekuan awal berlangsung selama 5 hingga 9 menit pada suhu di atas uap nitrogen cair. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu pra pembekuan terhadap kualitas semen beku.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dijalankan selama enam minggu di Laboratorium Yayasan Williams dan Laura yang terletak di Tilong, Desa Oelnasi, Kecamatan Kupang Tengah, Kabupaten Kupang, Nusa Tenggara Timur (NTT). Jangka waktu tersebut meliputi satu minggu untuk persiapan dan lima minggu untuk pengumpulan data.

Materi Penelitian

Materi penelitian berupa semen yang ditampung dari empat ekor babi jantan yang berumur 2-3 tahun. Babi-babi tersebut ditempatkan sendiri-sendiri dalam kandang yang memiliki perlengkapan makan dan minum.

Metode Penelitian

Penelitian ini adalah jenis penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan

acak lengkap. Terdapat empat perlakuan terkait waktu pre-freezing dan diulang sebanyak empat kali, sehingga total terdapat 16 unit percobaan. Formulasi perlakuan menggunakan pengencer spermax dengan tambahan kuning telur dan 6% gliserol, dengan variasi waktu pre-freezing sebagai berikut: P₁ (3 menit), P₂ (6 menit), P₃ (9 menit), dan P₄ (12 menit).

Penyiapan Kuning Telur

Kuning telur yang digunakan adalah telur ayam ras. Telur dibersihkan dengan kapas yang dibasahi dengan alkohol 70% dan dikeringkan menggunakan kapas hingga kering, kemudian pecahkan telur dari cangkangnya. Pisahkan putih telur dari kuningnya lalu kuning telur diletakkan diatas kertas saring untuk menyerap putih telurnya. Sayat selaput vitelin kuning telur menggunakan pipet lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur dan di tutup kertas aluminium foil.

Penyiapan Pengencer Spermax

Untuk membuat pengencer spermax, pertama-tama ditimbang spermax sebanyak 25 gram. Spermax yang telah dilakukan penimbangan, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer, dan kemudian ditambahkan 250 mL akuades. Selanjutnya, ditambahkan kuning telur sebanyak 10% dan gliserol sebanyak 6%. Campuran tersebut lalu, campuran dijadikan homogen dengan bantuan *stirrer* dan *spin bar*. Setelah homogen, pengencer dimasukkan ke dalam tabung-tabung perlakuan yang telah disiapkan dan siap digunakan.

Evaluasi Semen

Semen yang telah dikumpulkan diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis untuk menilai kualitasnya sebelum dibekukan. Pemeriksaan makroskopis semen segar dievaluasi berdasarkan volume, warna, kekentalan, dan nilai pH yang diukur. Sementara itu, pemeriksaan mikroskopis melibatkan analisis pergerakan (motilitas), daya hidup (viabilitas), bentuk abnormal, dan jumlah (konsentrasi) spermatozoa.

Pengenceran, Pra Pembekuan, dan Pembekuan Semen

Semen dengan kualitas yang memenuhi standar dipisahkan ke dalam wadah-wadah yang sudah berisi larutan pengencer utama. Semen yang telah diencerkan ini kemudian didiamkan selama dua jam (*holding time*) pada suhu ruangan (27-28°C), diikuti dengan proses

pemisahan spermatozoa dari plasma seminal dilakukan melalui sentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Setelah sentrifugasi, bagian atas cairan (supernatan) dipisahkan dan dibuang. Kemudian, endapan di bagian bawah tabung (pelet) yang kaya akan spermatozoa dilarutkan kembali menggunakan larutan pengencer dasar.

Semen yang sudah diencerkan selanjutnya ditempatkan ke dalam straw berukuran 0,5 mL dengan konsentrasi yang ditargetkan sebesar 200 juta sel spermatozoa per 0,5 mL. Setelah pengemasan dan penataan dalam rak pembeku, ekuilibrasi dilakukan pada temperatur 3-5°C selama periode dua jam, lalu dievaluasi kembali. Langkah berikutnya adalah *pre-freezing* yang dilakukan dengan menempatkan straw berisi sampel semen pada jarak 10 cm di atas permukaan nitrogen cair ($\pm 110^{\circ}\text{C}$) selama durasi waktu yang ditentukan. Setelah pra pembekuan selesai, *straw* langsung dimasukkan ke dalam nitrogen cair (-196°C). *Straw* yang sudah dibekukan diletakkan di dalam goblet, kemudian dipindahkan ke dalam canister untuk disimpan dalam kontainer yang berisi nitrogen cair hingga proses pembekuannya stabil. Evaluasi terhadap semen beku dilakukan minimal 24 jam setelah penyimpanan, dengan cara pencairan kembali *straw* dicemplung kedalam waterbath yang berisi air pada temperatur 37°C selama 30 detik. Kemudian, dilakukan pemeriksaan terhadap pergerakan (motilitas), daya hidup (viabilitas), dan bentuk abnormal spermatozoa.

Variabel Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah:

1. Motilitas spermatozoa merujuk pada kemampuan sperma untuk bergerak maju secara progresif. Perhitungan motilitas dilakukan untuk membedakan antara spermatozoa yang hidup dan yang mati. Spermatozoa yang tidak menunjukkan pergerakan maju atau hanya bergerak di tempat diklasifikasikan sebagai spermatozoa mati, sementara spermatozoa yang memperlihatkan pergerakan progresif menunjukkan sperma yang hidup. Penilaian motilitas dilakukan secara subjektif dengan memperkirakan persentase sperma yang bergerak progresif dalam sepuluh bidang pandang mikroskop, dengan rentang nilai 0-100% dan interval skala 5%.

- Viabilitas spermatozoa, atau daya hidup sperma, sangat dipengaruhi oleh ketersediaan nutrisi. Sperma menggunakan nutrisi sebagai sumber energi, sehingga kekurangan nutrisi dapat menyebabkan penurunan viabilitas Blegur *et al.* (2020). Rumus perhitungan viabilitas spermatozoa adalah:

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

- Abnormalitas pada spermatozoa dapat dikategorikan menjadi dua jenis, yaitu abnormalitas primer dan sekunder. Persentase abnormalitas spermatozoa dihitung berdasarkan perbandingan jumlah spermatozoa abnormal dengan jumlah spermatozoa normal (Fitri dan Supartini, 2012). Untuk menghitung jumlah spermatozoa abnormal adalah:

$$\text{Abnormalitas} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa Abnormal}}{\text{Total Spermatozoa yang Terhitung}} \times 100\%$$

- Recovery rate* (RR) dihitung dengan membandingkan persentase motilitas

spermatozoa setelah proses pencairan dengan persentase motilitas spermatozoa segar Marlize *et al.* (2021). Sederhananya, *recovery rate* menunjukkan seberapa besar kemampuan spermatozoa untuk mempertahankan pergerakannya setelah proses pembekuan dan *thawing* dibandingkan dengan kondisi awalnya. Kenaikan nilai RR mengindikasikan keberhasilan yang lebih besar dalam proses pembekuan yang diterapkan dalam mempertahankan kualitas motilitas spermatozoa.

$$\text{Recovery Rate} = \frac{\text{Nilai Motilitas Pasca Thawing}}{\text{Nilai Motilitas Semen Segar}} \times 100\%$$

Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisis menggunakan *analisis varians* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Proses analisis statistik ini dilakukan dengan bantuan perangkat lunak *SPSS 27* untuk sistem operasi *Windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini memanfaatkan semen yang belum diproses yang berasal dari yang ditampung. Hasil pemeriksaan makroskopis menunjukkan volume rata-rata semen adalah 118,75±38,08 mL, cenderung lebih rendah dari penelitian lain namun masih dalam rentang

normal (100-450 mL). Warna dan konsistensi semen berbeda dari laporan sebelumnya, tetapi pH 6,55 masih dalam batas normal (6,4-7,8). Perbedaan karakteristik makroskopis ini diduga dipengaruhi oleh usia, rangsangan, frekuensi ejakulasi, pakan, dan lingkungan.

Tabel 1. Karakteristik semen segar.

Parameter	Nilai
Makroskopis	
Volume (ml)	118.75 ± 38.08
Warna	Putih Susu
pH	6.55 ± 0.17
Konsistensi	Sedang
Mikroskopis	
Motilitas (%)	80.00 ± 0.00
Viabilitas (%)	94.71 ± 4.63
Abnormalitas (%)	6.15 ± 1.39
Konsentrasi (x10 ⁶ sel/mL)	276.00 ± 131.49

Pada pemeriksaan mikroskopis, motilitas spermatozoa mencapai 80,00%, lebih tinggi dari penelitian lain. Konsentrasi spermatozoa (276,00 x 10⁶ sel/mL) serupa dengan penelitian sebelumnya. Motilitas dan konsentrasi ini dipengaruhi oleh faktor-faktor seperti usia,

volume ejakulat, interval penampungan, kondisi pejantan, dan lingkungan. Viabilitas spermatozoa (94,71%) juga lebih tinggi dari penelitian lain, dan tingkat abnormalitas spermatozoa (6,15%) tergolong sangat baik (di bawah 20%).

Pengaruh Waktu Pra Pembekuan Terhadap Motilitas Spermatozoa

Pergerakan progresif spermatozoa (motilitas) memegang peranan krusial dalam proses pembuahan (fertilisasi) (Nahak *et al.* 2022). Kemampuan spermatozoa untuk bergerak maju sangat penting agar dapat mencapai dan

membuahi sel telur (ovum) di saluran reproduksi betina. Standar Nasional Indonesia (SNI, 2024) menetapkan bahwa motilitas spermatozoa setelah pencairan minimal harus 30% agar layak digunakan untuk inseminasi. Motilitas spermatozoa dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan nilai motilitas spermatozoa beku dengan perbedaan waktu pra pembekuan (%).

Tahapan Evaluasi	Waktu Pra Pembekuan (Menit)				P. Value
	3	6	9	12	
PP	78,75±1,44 ^a	78,75±1,44 ^a	78,75±1,44 ^a	78,75±1,44 ^a	1,00
PE	70,63±5,54 ^a	70,63±5,54 ^a	70,63±5,54 ^a	70,63±5,54 ^a	1,00
PT	10,00±5,40 ^a	30,00±6,77 ^b	37,50±4,08 ^b	34,38±6,57 ^b	0,00

Keterangan: ^{a,b} Superscript yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0,05). PP : Pasca pengencer, PE : Pasca Ekuilibrasi, PT : Pasca Thawing

Berdasarkan analisis statistik, dapat disimpulkan bahwa durasi *pre-freezing* tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan (P>0,05) dalam pergerakan spermatozoa yang diamati sebelum proses pembekuan, yaitu setelah tahap ekuilibrasi. Akan tetapi, variasi dalam durasi waktu sebelum pembekuan terbukti memberikan pengaruh yang signifikan (P<0,05) terhadap persentase pergerakan spermatozoa pasca proses kriopreservasi dan pencairan. Hasil pengujian lanjutan menunjukkan yang mana pada pasca pengenceran mempunyai nilai motilitas yang sama 78,75±1,44%, hal ini dikarenakan pengencer yang baik dapat mempertahankan nilai motilitas.

Kualitas semen setelah proses ekuilibrasi menunjukkan tingkat motilitas yang sama, yaitu 70,63±5,54%. Penurunan nilai motilitas ini dibandingkan setelah pengenceran disebabkan oleh *cold shock* akibat perubahan suhu drastis dari 27-28°C menjadi 3-5°C, yang merusak membran spermatozoa. Masalah ini konsisten dengan pendapat Pratiwi *et al.* (2014), yang menunjukkan adanya penurunan motilitas setelah proses pendinginan diduga disebabkan oleh berkurangnya kadar fosfolipid. Fosfolipid merupakan bagian tak terpisahkan dari membran sel sperma yang berperan melindungi sel dari *cold shock*. Proses ekuilibrasi bertujuan mengadaptasi sperma terhadap paparan lingkungan dingin selama 4 jam pada suhu 5°C berpotensi mengakibatkan penurunan pergerakan (motilitas) spermatozoa. Setiono *et al.* (2015) menjelaskan bahwa pendinginan pada suhu 5°C memicu akumulasi asam laktat sebagai

produk hasil buangan metabolisme sel, yang mengakibatkan lingkungan mengalami perubahan menjadi lebih bersifat asam akibat turunnya pH dan bersifat toksik bagi spermatozoa.

Kualitas semen setelah pembekuan menit ke-3 secara statistik berbeda signifikan (P<0,05) dari menit ke 6, 9, dan 12 menit. Waktu pra pembekuan pada menit ke-9 sesudah pembekuan menghasilkan nilai motilitas yang lebih tinggi 37,50±4,08% dibandingkan dengan menit ke 3 10,00±5,40%, menit ke 6 30,00±6,77%, dan menit ke 12 34,38±6,57%. Waktu pra pembekuan pada menit ke-9 memberikan waktu yang cukup bagi sel spermatozoa untuk mengalami dehidrasi yang terkontrol untuk meminimalkan pembentukan kristal es intraseluler dan menyerap krioprotektan yang cukup untuk melindungi struktur seluler. Perbedaan tingkat pergerakan spermatozoa (motilitas) sebelum pembekuan kemungkinan disebabkan oleh tingginya angka kematian spermatozoa, hal ini disebabkan oleh penurunan suhu yang berlangsung dengan sangat cepat. Tidak adanya cukup waktu bagi spermatozoa untuk beradaptasi dengan suhu sekitar -110°C sebelum terpapar nitrogen cair (-196°C) mengakibatkan kerusakan yang signifikan disebabkan oleh kejutan suhu dingin dan terbentuknya kristal es di dalam sel. Sebaliknya, durasi pembekuan awal selama 9 menit memberikan kesempatan yang lebih baik bagi spermatozoa untuk beradaptasi dengan penurunan suhu secara bertahap, sehingga mengurangi kerusakan tersebut. Motilitas terbaik ditunjukkan oleh pergerakan progresif

spermatozoa, yaitu gerakan aktif maju. Data yang diperoleh dalam riset ini memperlihatkan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian oleh Yusuf *et al.* (2017), yang melaporkan nilai motilitas spermatozoa dalam BTSgT sebesar $30,00 \pm 4,47\%$, Sugiantini *et al.* (2023) dengan motilitas spermatozoa beku babi sebesar 22%, dan Dongkot *et al.* (2022) yang mencatat motilitas semen beku babi duroc sebesar $23,12 \pm 2,39\%$. Perbedaan hasil motilitas setelah pencairan antar penelitian kemungkinan disebabkan oleh variasi bahan pengencer yang digunakan. Efektivitas suatu bahan pengencer dalam menjaga kualitas spermatozoa dapat berbeda-beda, bahkan pada jenis ternak yang sama.

Menurut Pratiwi *et al.* (2014), pembentukan kristal es dalam tahapan pembekuan semen, perubahan konsentrasi elektrolit yang ekstrem dapat merusak spermatozoa. Kadar elektrolit yang terlalu tinggi berpotensi merusak lapisan lipoprotein pada dinding sel sperma, yang mengakibatkan kerusakan pada lapisan pelindung sel yang mengakibatkan kematian sel akibat ketidakseimbangan internal akibat tekanan dingin dapat dikurangi dengan perlindungan terhadap perubahan yang disebabkan oleh pembekuan (Feradis, 2009).

Sebagian permasalahan kerusakan pada membran plasma spermatozoa akibat proses pembekuan dapat diminimalkan dengan penambahan krioprotektan ke di dalam larutan pengencer dan dengan penurunan temperatur yang perlahan. Adanya gliserol dalam larutan pengencer membantu sel sperma untuk resisten terhadap penurunan temperatur, sehingga meminimalkan potensi kerusakan akibat pembentukan kristal es intraseluler dan kehilangan air berlebihan dari dalam sel Tambing *et al.* (2000). Sementara itu, Pratiwi *et al.* (2014) menyatakan bahwa kerusakan hingga 20% dari total spermatozoa selama pembekuan masih dianggap sebagai hasil yang dapat diterima.

Berdasarkan data hasil penelitian (Tabel 2), waktu sebelum pembekuan selama 6, 9, dan 12 menit memberikan indikasi hasil yang lebih positif pada kualitas semen dibandingkan dengan 3 menit. Nilai tertinggi diperoleh pada pra pembekuan 9 menit sebesar 37,50%, diikuti oleh 12 menit sebesar 34,38%, dan 6 menit sebesar 30,00%. Ketiga nilai tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan dalam inseminasi

buatan, di mana nilai motilitas setelah pembekuan harus sebesar 30% (SNI, 2024).

Pengaruh Waktu Pra Pembekuan Terhadap Viabilitas Spermatozoa

Penilaian daya hidup spermatozoa (viabilitas) dilakukan dengan metode pewarnaan diferensial yang objektif. Dalam metode ini, spermatozoa hidup akan tampak transparan pada bagian kepalanya karena tidak menyerap pewarna, sementara spermatozoa mati akan memiliki kepala akan tampak berwarna merah akibat penyerapan pewarna. Pemeriksaan daya hidup spermatozoa (viabilitas) memiliki peran penting karena berhubungan erat dengan pergerakannya (motilitas). Semakin tinggi tingkat motilitas spermatozoa, umumnya diikuti dengan tingkat viabilitas yang tinggi pula. Fenomena ini kemungkinan disebabkan oleh penilaian motilitas hanya dilakukan pada spermatozoa yang bergerak maju secara aktif (progresif), sementara spermatozoa yang hidup tidak selalu memiliki kemampuan bergerak progresif (Djawapatty *et al.*, 2018). Hal ini dikarenakan sebagian besar spermatozoa hidup, tetapi banyak yang telah kehilangan kemampuan fungsionalnya untuk bergerak maju. Hal ini sering terjadi setelah proses pembekuan-pencairan (*thawing*) karena kerusakan akibat dingin.

Berdasarkan pemeriksaan pasca pengenceran dan pasca ekuilibrisasi secara statistik, perlakuan tidak menunjukkan dampak yang signifikan ($P > 0,05$) pada tingkat daya hidup spermatozoa sebelum proses pembekuan. Akan tetapi, setelah pembekuan dan pencairan, perlakuan memberikan pengaruh yang signifikan secara statistik ($P < 0,05$) pada tingkat daya hidup (viabilitas) spermatozoa (terlihat pada Tabel 3).

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa persentase spermatozoa yang tetap hidup setelah proses setelah pencairan berbeda-beda tergantung pada variasi waktu pra pembekuan selama 6 menit, 9 menit, dan 12 menit menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dalam mempengaruhi viabilitas spermatozoa setelah pembekuan. Namun, waktu pra pembekuan selama 3 menit tidak ditemukan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) antara hasil perlakuan ini dan perlakuan lainnya. Waktu pra pembekuan pada pasca pengenceran memiliki nilai viabilitas yang sama pada menit ke 3, 6, 9, dan 12 menit sebesar $94,61 \pm 3,91\%$, hal ini dikarenakan pengencer dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa dan pengencer ini

mengandung krioprotektan berperan penting dalam menjaga keutuhan membran sel sperma

dan mencegah kerusakan fisik atau mekanis (Rizal, 2009).

Tabel 3. Rataan nilai viabilitas spermatozoa beku dengan perbedaan waktu pra pembekuan (%).

Tahapan Evaluasi	Waktu Pra Pembekuan (Menit)				P. Value
	3	6	9	12	
PP	94,61±3,91 ^a	94,61±3,91 ^a	94,61±3,91 ^a	94,61±3,91 ^a	1,00
PE	85,48±4,48 ^a	85,48±4,48 ^a	85,48±4,48 ^a	85,48±4,48 ^a	1,00
PT	31,65±1,82 ^a	59,07±11,77 ^b	71,16±0,77 ^b	67,56±11,71 ^b	0,00

Keterangan: ^{a,b} Superscript yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). PP : Pasca Pengencer, PE : Pasca Ekuilibrase, PT : Pasca Thawing

Nilai daya hidup spermatozoa (viabilitas) dalam penelitian ini adalah 85,48±4,48%, yang tergolong baik karena lebih tinggi dibandingkan penelitian Yusuf *et al.* (2017) sebesar 70,80% dan Dongkot *et al.* (2022) sebesar 45,44% pada spermatozoa babi peranakan Landrace. Penurunan nilai viabilitas dari setelah pengenceran disebabkan oleh berkurangnya kandungan nutrisi dalam bahan pengencer spermax, kuning telur, dan gliserol seiring dengan bertambahnya durasi penyimpanan. Konsekuensinya, jumlah spermatozoa yang berhasil bertahan hidup setelah proses pembekuan dan setelah pencairan juga mengalami penurunan. Fenomena ini sejalan dengan pendapat Stefania *et al.* (2024) bahwa durasi durasi penyimpanan sangat berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa, yang mana semakin lama disimpan, kandungan nutrisi dalam bahan pengencer akan semakin berkurang.

Viabilitas spermatozoa setelah pencairan tertinggi yaitu 71,16% diperoleh pada perlakuan waktu pra pembekuan selama 9 menit. hal ini dikatakan baik karena nilainya lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yusuf *et al.* (2017) yang melaporkan nilai daya hidup sebesar 70,80%, begitupun Dongkot *et al.* (2022) yang menyatakan bahwa nilai daya hidup (viabilitas) spermatozoa babi peranakan landrace sebesar 45,44%.

Tabel 3 menunjukkan bahwa penggunaan pengencer spermax, kuning telur, dan penambahan gliserol dengan perbedaan waktu pra pembekuan secara signifikan memengaruhi daya hidup spermatozoa ($P < 0,01$). Menurut Nahak *et al.* (2022), semen berkualitas baik memiliki tingkat viabilitas di atas 50%. Hal ini disebabkan karena pengencer spermax mengandung antibiotik dan glukosa sebagai sumber energi untuk spermatozoa. Glukosa, sebagai karbohidrat, menyediakan energi yang

mendukung pergerakan dan daya hidup spermatozoa, sehingga membantu sel spermatozoa bertahan lebih lama. Selain itu, kuning telur yang terkandung dalam pengencer memiliki kandungan lipoprotein dan lesitin dalam kuning telur sangat penting untuk menjaga dan melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat penurunan suhu drastis (*cold shock*) tanpa menimbulkan efek toksik. Temuan ini didukung oleh Suharyati dan Hartono (2011) yang menyatakan bahwa kuning telur kaya akan nutrisi yang esensial bagi spermatozoa. Di samping itu, kandungan kolesterol dan karoten dalam kuning telur dapat memicu aktivitas enzim-enzim penting dalam metabolisme spermatozoa, seperti suksinat dehidrogenase, malat dehidrogenase, dan gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase. Karbohidrat dalam bahan pengencer berperan sebagai sumber energi, pengatur keseimbangan cairan (tekanan osmotik), dan pelindung sel dari kerusakan saat pembekuan di luar sel (krioprotektan ekstraseluler). Sedikit penambahan glukosa juga terbukti berperan dalam meningkatkan dan memperpanjang daya hidup (viabilitas) spermatozoa Nahak *et al.* (2022). Selain itu, kuning telur juga mengandung senyawa yang bertindak sebagai sumber energi oksidatif, pelindung enzim sulfhidril, dan mencegah penggumpalan (aglutinasi) spermatozoa dalam plasma semen mamalia (Nahak *et al.*, 2022).

Jumlah spermatozoa hidup setelah proses pra-pembekuan masih tergolong baik meskipun terjadi penurunan. Penurunan ini disebabkan oleh *cold shock* dan kerusakan pada membran spermatozoa akibat pembentukan kristal es. Pembentukan kristal es memicu perbedaan tekanan osmotik antara lingkungan eksternal dan internal sel, yang berujung pada peningkatan tingkat kematian spermatozoa. Pratiwi *et al.* (2014) menjelaskan bahwa peningkatan tekanan osmotik dalam plasma semen dapat

mengganggu fungsi normal membran spermatozoa untuk ditembus zat (permeabilitas) dan meningkatkan kerusakannya, yang berujung pada kematian spermatozoa. Bentuk abnormal yang teridentifikasi dalam penelitian ini adalah ekor putus.

Pengaruh Waktu Pra Pembekuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa adalah indikator penting kualitasnya. Bentuk sel abnormal dapat menurunkan tingkat kesuburan

Bria *et al.* (2022). Setiap sperma dengan morfologi tidak normal tidak akan mampu membuahi sel telur, terlepas dari kapan kelainan tersebut muncul (baik di dalam testis, saluran reproduksi jantan, saat ejakulasi, maupun selama proses penanganan semen) dan pelaksanaan inseminasi buatan. Hasil penelitian mengenai tingkat abnormalitas spermatozoa menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya waktu pra pembekuan ($P>0,05$).

Tabel 4. Rataan nilai abnormalitas spermatozoa beku dengan perbedaan waktu pra pembekuan (%).

Tahapan Evaluasi	Waktu Pra Pembekuan (Menit)				P. Value
	3	6	9	12	
PP	8,33±2,63	8,33±2,63	8,33±2,63	8,33±2,63	1,00
PE	7,67±2,26	7,67±2,26	7,67±2,26	7,67±2,26	1,00
PT	9,57±0,30	9,63±1,57	10,09±1,43	9,55±1,54	0,92

Keterangan: ^{a,b} Superscript yang memiliki huruf yang serupa dalam baris yang sama menunjukkan bahwa perbedaannya tidak signifikan ($P>0,05$). PP: Pasca pengencer, PE: Pasca Ekuilibrasi, PT: Pasca Thawing

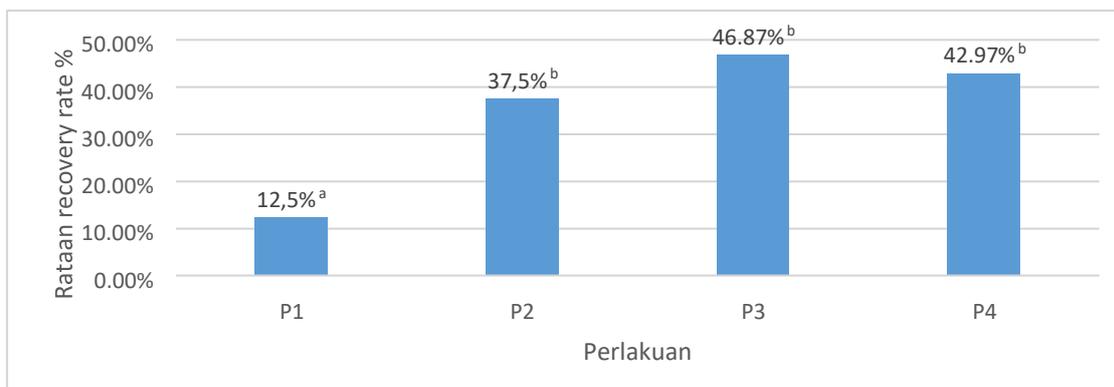
Berdasarkan data hasil penelitian diketahui nilai abnormalitas spermatozoa mencapai 10,09%. Hasil abnormalitas spermatozoa dalam penelitian ini masih dapat dikategorikan baik, mengingat Foeh *et al.* (2015) melaporkan nilai spermatozoa yang tidak normal sebesar 11,1%. Sementara itu, Marlize *et al.* (2021) menyatakan bahwa nilai abnormalitas spermatozoa babi per ejakulasi sebaiknya tidak melebihi 20%. Perbedaan tingkat kelainan (abnormalitas) spermatozoa pada setiap perlakuan disebabkan oleh ketidakstabilan keseimbangan cairan antara bagian dalam dan luar sel spermatozoa akibat penurunan temperatur selama ekuilibrasi Tuhi *et al.* (2013). Hal ini didukung oleh penelitian Dongkot *et al.* (2022) yang menyatakan bahwa perbedaan konsentrasi cairan di dalam dan di luar sel dapat memicu perubahan tekanan osmotik selama proses pembekuan. Perubahan tekanan osmotik ini berpotensi mengakibatkan pecahnya lapisan lipoprotein dan kerusakan pada membran sel spermatozoa, yang pada akhirnya menyebabkan kelainan bentuk. Selain itu, perbedaan kecepatan pembekuan spermatozoa dalam media yang berbeda juga berpotensi memengaruhi tingkat kelainan. Hal ini disebabkan oleh perubahan kondisi lingkungan fisik, termasuk tekanan osmotik dan pembentukan kristal es di dalam sel. Kondisi-kondisi ini dapat mengakibatkan

perubahan pada struktur spermatozoa, seperti ekor yang melingkar atau kepala yang terlepas (Siregar, 2018). Pada umumnya, berbagai faktor dapat menyebabkan kelainan pada spermatozoa, termasuk faktor keturunan, tekanan (stres), suhu lingkungan, adanya penyakit, bahkan proses pembekuan semen itu sendiri (Nahak *et al.*, 2022).

Recovery Rate Spermatozoa

Recovery Rate (RR) merupakan indikator yang mengukur kemampuan spermatozoa untuk memulihkan pergerakannya setelah proses pembekuan. Perhitungannya dilakukan dengan membandingkan pergerakan spermatozoa setelah pembekuan dengan motilitas spermatozoa segar Komariah *et al.* (2013). Penghitungan RR memiliki peran penting dalam mengevaluasi keberhasilan kriopreservasi semen dan juga mencerminkan Ini menunjukkan keberhasilan pembekuan. Semakin tinggi nilai RR, semakin baik hasilnya pula hasil dari proses pembekuan tersebut dalam mempertahankan kualitas motilitas spermatozoa.

Rerata RR spermatozoa maksimum tercapai pada durasi pre-freezing selama menit ke 9 yaitu 46,87%, diikuti oleh menit ke 12 yaitu 42,97%, diikuti lagi menit ke 6 yaitu 37,59%, dan terendah pada menit ke 3 yaitu 12,34% Gambar 1.



Keterangan : ^{a,b} Superscript yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$).
P1: 3 menit, P2: 6 menit, P3: 9 menit, P4: 12 menit.

Gambar 1. *Recovery Rate Spermatozoa*

Berdasarkan analisis statistik, durasi pra pembekuan memberikan efek yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap nilai *recovery rate* (RR) spermatozoa. Tingginya RR pada pra-pembekuan selama 9 menit (46,87%) mengindikasikan bahwa jumlah spermatozoa yang tetap bergerak setelah pembekuan juga tinggi. Hasil penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Komariah *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa sekitar 40% spermatozoa yang dibekukan akan mengalami kerusakan. Sementara itu, Koelima *et al.* (2022) melaporkan nilai RR semen beku babi duroc sebesar 36,61% sedangkan penelitian oleh Marlize *et al.* (2021) mencatat nilai RR semen beku sebesar 43,74%, dan Dongkot *et al.* (2022) melaporkan 33,03% untuk babi duroc. Hasil tertinggi RR dalam penelitian ini (pada perlakuan P3 dengan pre-freezing 9 menit) secara signifikan melampaui

temuan dari Koelima *et al.* (2022), Marlize *et al.* (2021), dan Dongkot *et al.* (2022). Kondisi ini berkaitan erat dengan integritas membran plasma spermatozoa, yang vital untuk metabolisme dan motilitas optimal setelah pembekuan dan pencairan. Sebagaimana ditegaskan oleh Marlize *et al.* (2021), penurunan motilitas spermatozoa berkorelasi negatif dengan RR, dan RR yang tinggi sangat dipengaruhi oleh proporsi spermatozoa yang bergerak progresif.

Pentingnya dilakukan pengukuran *recovery rate* adalah untuk mengevaluasi seberapa efektif protokol pembekuan yang digunakan termasuk jenis pengencer, krioprotektan, kecepatan pendinginan, dan waktu ekuilibrase. *Recovery rate* yang tinggi menunjukkan bahwa protokol tersebut berhasil meminimalkan kerusakan sel selama proses pembekuan.

SIMPULAN

Berdasarkan uraian, dapat ditarik kesimpulan bahwa waktu pra pembekuan menit ke 9 dengan menggunakan pengencer spermax dengan kuning telur 10% dan gliserol 6%

memberikan respon yang tepat untuk mempertahankan mutu spermatozoa beku pada Babi Landrace.

SARAN

Diperlukan riset lebih lanjut guna menguji daya fertilitas spermatozoa beku untuk inseminasi buatan pada ternak babi betina.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariantie, O.S., Yusuf, T.L., Sajuthi, D., & Arifiantini, R.I. 2013. Effect of glycerol and dimethylformamide (DMF) cryoprotectants on buck Etawah Crossbreed frozen semen using modified tris diluents. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 18(4): 239-250. <https://doi.org/10.14334/jitv.v18i4.327>
- Banamtuan, A.N., Nalley, W.M., & Hine, T.M. 2021. Kualitas Semen Cair Babi Duroc dalam Pengencer Durasperm yang Disuplementasi Air Buah Lontar dan Sari Tebu. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 16(1): 41-48. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.16.1.41-48>
- Berek, F.L., Dethan, A.A., & Tahuk, P.K. 2021. Pengaruh Lama Simpan Semen Pejantan Babi Duroc yang Diencerkan Menggunakan Pengencer Tris-Kuning Telur air Kelapa Muda Terhadap Nilai Viabilitas, Abnormalitas, dan Derajat Keasaman (pH). *Journal of Tropical Animal Science and Technology*. 3(2): 108-120. <http://dx.doi.org/10.32938/jtast.v3i2.1201>
- Blegur, J., Nalley, W.M., & Hine, T.M. 2020. Pengaruh penambahan virgin coconut oil dalam pengencer tris kuning telur terhadap kualitas spermatozoa Sapi Bali selama preservasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 7(2): 130-138. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v7i2.2997>
- Bria, M.M., Nalley, W.M., Kihe, J.N., & Hine, T.M. 2022. Pengaruh substitusi sari buah semangka (*Citrullus lanatus*) dalam pengencer sitrat-kuning telur terhadap kualitas spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 23-32. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.4393>
- Djawapatty, D.J., Belli, H.L.L., & Hine, T.M. 2018. Fertilisasi In Vitro dan In Vivo Spermatozoa Pada Pengencer Sitrat Kuning Telur yang Disuplementasi Berbagai Level Fruktosa pada Penyimpanan Suhu 18°C. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 13(1): 43-54. <https://doi.org/10.31186/jspi.id.13.1.4354>
- Dongkot, S., Marawali, A., Hine, T.M., & Nalley, W.M. 2022. Kualitas Semen Beku Babi Duroc Dalam Pengencer Tris Modifikasi Dengan Waktu Ekuilibrasi yang Berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 72-84. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.5491>
- Feradis. 2009. Peran Antioksidan dalam Pembekuan Semen. *Jurnal Peternakan*. 6(2): 63-70. <https://doi.org/10.24014/jupet.v6i2.379>
- Foeh, N.D.F.K., Arifiantini, R.I., & Yusuf, T.L. 2016. Viabilitas Spermatozoa Semen Beku Babi Duroc Dalam Extender Beltsville Thawing Solution. *Jurnal Kajian Veteriner*. 4(1): 24-32. <https://doi.org/10.35508/jkv.v4i1.1013>
- Komarlah, K., Arifiantini, L., & Nugraha, F.W. 2013. Kaji Banding Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental, Limousin, dan Friesian Holstein Terhadap Proses Pembekuan. *Buletin Peternakan*. 37(3): 143-147. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v37i3.3078>
- Koelima, B.V., Belli, H.L.L., Kihe, J.N., & Nalley, W.M. 2022. Pengaruh Lama Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Babi Duroc Dalam Pengencer Tris-Modifikasi Dengan Penambahan Krioprotektan. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 9(1): 92-100. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.5490>
- Marlize, S., Hine, T.M., & Nalley, W.M. 2021. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Dalam Pengencer Durasperm Termodifikasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 8(2): 150-160. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v8i2.4867>
- Nahak, P.L., Dethan, A.A., & Kia, K.W. 2022. Kualitas Semen Dalam Pengencer Semen SitratKuning Telur yang Ditambah Glukosa Dengan Konsentrasi Berbeda. *JAS*. 7(1): 12-15. <https://doi.org/10.32938/ja.v7i1.1593>
- Ngongo, D.B., Hine, T.M., Riwu, A.R., & Nalley, W.M. 2024. Pengencer Spermax Terhadap Kualitas Semen Cair. *Jurnal Penelitian Ilmu Humaniora*. 7(7): 17-28. <https://humaniora.ojs.co.id/index.php/jpih/article/view/333>
- Rangkuti, N.J., Suteky, T., & Putranto, H.D. 2021. Pengaruh Waktu Pra Pembekuan Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali di UPTD IB Bengkulu. *Prosiding*

- Seminar Nasional Pembangunan dan Pendidikan Vokasi Pertanian*. 2(1): 165-176.
<https://doi.org/10.47687/snppvp.v2i1.183>
- Pratiwi, R.I., Suharyati, S., & Hartono, M. 2014. Analisis kualitas semen beku Sapi Simmental menggunakan pengencer andromed dengan variasi waktu pra pembekuan. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(3): 8-15.
<https://doi.org/10.23960/jipt.v2i3.p%25p>
- Rizal, M. 2009. Daya Hidup Spermatozoa Epididimis Sapi Bali yang Dipreservasi Pada Suhu 3-5°C dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang Berbeda. *JITV*. 14(2): 142-149.
<https://core.ac.uk/download/pdf/236132729.pdf>
- Seran, S.V., Foeh, N.D.F.K., & Ndaong, N.A. 2023. Pengaruh Sari Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Babi. *Jurnal Kajian Veteriner*. 11(2): 174-184.
<https://doi.org/10.35508/jkv.v11i2.13014>
- Setiono, N., Suharyati, S., & Santosa, P.E. 2015. The research was conducted at the Technical Service Unit Area Regional Artificial Insemination Center of Lampung, Terbanggi Besar District. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 3(2): 61-69.
<https://doi.org/10.23960/jipt.v4i4.p%25p>
- Standar Nasional Indonesia. 2024. Semen Beku – Bagian 4: Babi.
<https://nakeswan.bsip.pertanian.go.id/berita/bsn-luncurkan-sni-semen-beku-babi>
- Stefania, Y., Kue, E., Kune, P., & Marawali, A. 2024. Pengaruh Kombinasi Pengencer Beltsville Thawing Solution dan Semen Life Terhadap Kualitas Spermatozoa. *Jurnal Penelitian Ilmu Humaniora*. 7(10): 1-10.
<https://humaniora.ojs.co.id/index.php/jpih/article/view/408>
- Sugiantini, N.L.M., Sumardani, N.L.G., & Suberata, I.W. 2023. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Babi Dengan Holding Time dan Lama Thawing Berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 10(2): 9-16.
<https://doi.org/10.35508/nukleus.v10i2.11175>
- Suharyati, S., & Hartono, M. 2011. Preservasi Dan Kriopreservasi Semen Sapi Limousin Dalam Berbagai Bahan Pengencer. *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*. 5(2): 53-58.
<https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v5i2.355>
- Sumardani, N.L.G., Budaarsa, K., Putri, T.I., & Puger, A.W. 2019. Umur Mempengaruhi Volume Semen dan Motilitas Spermatozoa di Balai Inseminasi Buatan Baturiti, Tabanan, Bali. *Jurnal Veteriner*. 20(3), 324.
<https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.3.324>
- Tambing, S.N., Toelihere, M.R., Yusuf, T.L., & Sutarna, I.K. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *JITV*. 5(2): 1-8.
<https://medpub.appertani.org/index.php/jitv/article/download/203/203>
- Tuhu, A.D., Ondho, Y.S., & Samsudewa, D.D. 2013. Pengaruh Perbedaan Waktu Pelepasan Water Jacket Dalam Proses Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Pada Tahap Before Freezing dan Post Thawing. *Animal Agricultural Journal*. 2(1): 466-477.
<http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/aaaj>
- Waluwanja, Y.U.D., Nalley, W.M., Hine, T.M., & Uly, K. 2019. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Minyak Zaitun Ekstra Virgin (*Oleum Olivae*) dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Babi Duroc. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 6(2): 55-62.
<http://ejournal.undana.ac.id/nukleus/article/view/2101>
- Yusuf, T., Arifiantini, R., Dapawole, R., & Nalley, W.M. 2017. Kualitas Semen Beku Babi Dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi dengan Trehalosa. *Jurnal Veteriner*. 18(1): 69-75.
<https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.1.69>