

KUALITAS SEMEN BEKU BABI DUROC DALAM PENGECER TRIS MODIFIKASI DENGAN WAKTU EKUILIBRASI YANG BERBEDA

(The frozen sperm quality of duroc pig in modified tris diluent with different equilibration time)

Selsiana Dongkot^{*}, Aloysius Marawali, Thomas M. Hine, Wilmientje M. Nalley

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

^{*}Correspondent author, email: selsidongkot01@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kualitas semen beku babi duroc dalam pengencer Tris modifikasi dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda. Semen dikoleksi dari dua ekor pejantan duroc dan dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen dengan motilitas $\geq 75\%$, konsentrasi $\geq 200 \times 10^6$ sel/ml dan abnormalitas $\leq 20\%$ diencerkan dalam pengencer Tris modifikasi, selanjutnya di holding time selama dua jam pada suhu ruang (27-28°C). Semen yang telah di holding time kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit. Pellet hasil sentrifuge diencerkan kembali dengan pengencer Tris modifikasi + gliserol 3%. Semen yang telah diencerkan dikemas dalam mini straw 0,5 ml dan diekuilibrasi sesuai dengan waktu ekuilibrasi perlakuan, yaitu P1: waktu ekuilibrasi 1 jam, P2: waktu ekuilibrasi 2 jam dan P3: waktu ekuilibrasi 3 jam. Setelah diekuilibrasi dibekukan di atas uap nitrogen cair (-110°C) pada jarak 5 cm selama 10 menit, kemudian disimpan dalam nitrogen cair (-196°C) dan dibiarkan selama 24 jam. Kemudian di thawing dengan air bersuhu 37°C selama 30 detik dalam water bath. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas, viabilitas, abnormalitas, MPU dan recovery rate nyata lebih tinggi ($P < 0,05$) pada ekuilibrasi 2 jam, yakni secara berturut-turut 23,12%, 45,44%, 4,65%, 50,15%, 33,03% dibandingkan dengan ekuilibrasi 1 dan 3 jam, yakni secara berturut-turut 20%, 42,17%, 8,19%, 42,67%, 28,57% dan 16,87%, 36,39%, 7,64%, 37,73%, 24,99%. Penelitian ini menyimpulkan bahwa lama waktu ekuilibrasi 2 jam menghasilkan kualitas semen beku babi duroc yang lebih tinggi dibandingkan 1 dan 3 jam.

Kata-kata kunci: ekuilibrasi, tris modifikasi, babi duroc, semen beku

ABSTRACT

This study aimed to examine the quality of frozen sperm of duroc boar in modified Tris diluent with different equilibration time. Semen was collected from two duroc males and evaluated macroscopically and microscopically. Semen with motility 75%, concentration 200×10^6 cell/mL and abnormality $< 20\%$ was diluted in Tris modified diluent, then held for two hours at room temperature (27-28°C). The semen that has been in the holding time is then centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes. The pellet from centrifuge were diluted again with modified Tris diluent + 3% glycerol. The diluted semen was packed in 0,50 mL mini straws and equilibrated according to the treatment equilibration time, namely P1: 1 hour equilibration time, P2: 2 hour equilibration time, P3: 3 hour equilibration time. After equilibration, it was frozen over liquid nitrogen vapor (-110°C) at a distance of 5 cm for 10 minutes, then stored in liquid nitrogen (-196°C) and left for 24 hours. Then thawing with warm water at 37°C for 30 seconds in a water bath. The result showed that motility, viability, abnormality, intact plasma membrane and recovery rate were significantly higher ($P < 0,05$) at two hour equilibration, namely 23.12%, 45.44%, 4.65%, 50.15%, 33.03% respectively compared to one and two hour equilibration time, namely 20%, 42.17%, 8.19%, 42.67%, 28.57% and 16.87%, 36.39%, 7.64%, 37.73%, 24.99% respectively. This study conclude that the equilibration time of two hours resulted in higher quality of frozen sperm of duroc boar than one and three hours.

Keywords: equilibration, modified tris, duroc boar, frozen semen

PENDAHULUAN

Salah satu teknologi reproduksi yang cukup efektif dan efisien untuk percepatan peningkatan populasi babi duroc adalah teknologi IB menggunakan semen cair maupun semen beku. Teknologi IB disamping mampu meningkatkan populasi dan mutu genetik ternak juga diharapkan dapat mempercepat penyebaran bibit ke wilayah produksi ternak yang masih terbelakang. Keberhasilan dari IB pada ternak dipengaruhi beberapa faktor, diantaranya adalah kualitas semen cair maupun semen beku yang digunakan (Yusuf *et al.*, 2006). Namun aplikasi IB pada ternak babi masih menemukan banyak kendala, terutama terbatasnya penyediaan semen beku babi karena sulit didapatkan, biayanya cukup mahal dan masih minimnya informasi tentang metode kriopreservasi yang tepat dalam mempertahankan motilitas spermatozoa setelah pembekuan.

Masalah utama yang sering terjadi dalam kriopreservasi semen adalah pengaruh cold shock terhadap sel spermatozoa yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air yang berlebihan, berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es dan penumpukan elektrolit di dalam larutan atau di dalam sel. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa dan pada waktu thawing, permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel spermatozoa (Toelihere, 1993). Disisi lain, penyimpanan semen dalam kondisi beku memungkinkan penggunaan semen dalam jangka waktu lama, tetapi pembekuan dapat mengakibatkan stres pada sel yang sering menghasilkan kerusakan membran serta penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa (Barrios *et al.*, 2000)

Permasalahan cold shock dan perubahan intraseluler tersebut dapat disiasati dengan menggunakan zat-zat pelindung (senyawa krioprotektan) dalam media pengencer, menurut Aboagla & Terada (2004) untuk menghasilkan kualitas semen beku yang berkualitas perlu

diperhatikan jenis dan konsentrasi krioprotektan yang digunakan dan teknik atau metode yang tepat dalam pembekuan semen. Salah satu bahan pengencer semen adalah Tris kuning telur yang berfungsi sebagai penyangga atau buffer, yang berguna dalam menstabilkan pH, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (cold shock) (Hoesni, 1997). Krioprotektan yang paling umum digunakan pada mamalia adalah gliserol (Kusumaningrum, 2002). Gliserol akan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan akan digunakan untuk aktivitas metabolisme oksidatif, menggantikan sebagian air yang bebas dan menurunkan konsentrasi elektrolit intraseluler dan mengurangi daya rusaknya terhadap spermatozoa dengan jalan memodifikasi pembentukan kristal-kristal es (Tambing *et al.*, 2000).

Efisien penggunaan zat pelindung selama pembekuan sangat dipengaruhi oleh waktu ekuilibrasi (Arifiantini, 2005). Waktu ekuilibrasi merupakan periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah. Penelitian mengenai pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen telah banyak dilaporkan pada semen sapi FH (Arifiantini *et al.*, 2005) 4 jam, Arruda *et al.* (2002) pada semen kuda selama 2 jam dalam krioprotektan gliserol dan etilen glikol 5%, Pasarelli *et al.* (2020) pada semen babi hibrida selama 2 jam dan Yi *et al.* (2002) pada semen babi hutan selama 2 atau 3 jam.

Mengetahui pentingnya waktu ekuilibrasi pada proses pembekuan semen dan penelitian tentang waktu ekuilibrasi pada ternak babi masih sangat kurang. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang kualitas semen beku babi duroc dalam pengencer tris modifikasi dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Ternak yang digunakan sebagai sumber semen adalah dua ekor pejantan duroc berumur 2-3 tahun yang telah terlatih dalam penampungan semen dan memiliki organ

reproduksi yang sehat. Pengambilan semen dilakukan pada pagi hari dengan periode dua kali seminggu. Semen hasil koleksi ditampung dalam tabung penampung yang dilengkapi

dengan kain kasa pada bagian atas tabung untuk menyaring fraksi gelatin.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan percobaan yang dipakai adalah rancangan acak lengkap (RAL), terdiri atas 3 perlakuan dan 4 ulangan, Ketiga perlakuan tersebut adalah: waktu ekuilibriasi 1 jam, waktu ekuilibriasi 2 jam dan waktu ekuilibriasi 3 jam.

Pembuatan Pengencer Semen

Tris (Hidroksimetil) aminomethane ditimbang sebanyak 3,63 gram, asam sitrat 1,99 gram dan 0,50 gram fruktosa dilarutkan dalam 100 ml aquabidest. Kemudian 20 mL kuning telur dilarutkan kembali dalam 80 mL larutan Tris, selanjutnya ditambahkan penicillin 1000 IU/mL dan streptomycin 1000 µg/mL. Penambahan kedua antibiotic ini disesuaikan dengan rumus pengenceran serta banyaknya semen yang akan diencerkan, kemudian tambahkan minyak zaitun sebanyak 12%. Kemudian dihomogenkan pada suhu 37°C. Untuk pengencer perlakuan sebanyak 96 mL Tris-kuning telur disiapkan kemudian tambahkan sukrosa 2 gram, gliserol 3%.

Penampungan dan Evaluasi Semen

Penampungan semen babi dilakukan dengan cara manual glove and hand method menggunakan dummy sow. Semen segar hasil koleksi segera dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi makroskopis meliputi volume, warna, pH, konsentrasi dan evaluasi secara mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas dan membran plasma utuh.

Pengenceran Semen

Semen yang telah dievaluasi diencerkan dalam 4 tabung yang berisi pengencer dasar

dengan perbandingan 1:1, dilakukan secara perlahan-lahan melewati dinding tabung, kemudian tabung diputar secara perlahan sampai larutan tersebut homogen. Selanjutnya holding time selama 2 jam pada suhu ruang (27-28°C). Semen yang telah mengalami holding time disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit, pellet yang dihasilkan diencerkan kembali menggunakan pengencer dasar dengan perbandingan 1:1. Kemudian diencerkan dalam pengencer perlakuan dengan konsentrasi 500x10⁶ sel/mL.

Pre Freezing, Freezing, dan Thawing

Semen yang telah diencerkan dalam pengencer perlakuan dikemas dalam mini straw 0,50 mL dan diberi kode atau label. Kemudian diekuilibriasi pada suhu 3-5°C sesuai dengan waktu ekuilibriasi perlakuan. Setelah diekuilibriasi dibekukan diatas uap N₂ cair bersuhu -110°C pada jarak 5 cm selama 10 menit. Kemudian meletakkan straw di dalam container N₂ cair dan dibiarkan selama 24 jam. Untuk mengetahui kualitas semen belu dilakukan pencairan kembali semen beku (thawing) menggunakan air bersuhu 37°C selama 30 detik dalam water bath.

Variabel Penelitian

Variabel yang diukur dalam penelitian ini adalah: (1) motilitas, (2) viabilitas, (3) abnormalitas, (4) membran plasma utuh, (5) recovery rate.

Analisis Data

Keseluruhan data yang diperoleh dianalisis dengan Analysis Of Variance (ANOVA) dan perlakuan yang berpengaruh nyata diuji lebih lanjut dengan menggunakan Duncan Multiple Range Test dengan program software SPSS 20.0 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Evaluasi semen segar dilakukan bertujuan untuk mengetahui kelayakannya untuk diproses lebih lanjut, karakteristik semen segar babi duroc dapat dilihat pada Table 1.

Dari Tabel 1 dapat dilihat rata-rata volume semen segar yang diperoleh selama penelitian adalah 164,75±24,11 ml. Hasil ini berbeda dengan penelitian Robert (2006) dan Ax *et al.*

(2000) yang menyatakan volume semen babi tanpa gelatin berkisar 200-250 ml. Hal ini disebabkan oleh volume semen tergantung spesies ternak, bangsa, bobot badan, umur, dan frekuensi penampungan (Kartasudjana, 2001), tingkat rangsangan, frekuensi ejakulasi dan kualitas pakan (Johnson *et al.*, 2000), fraksi semen yang ditampung (Robert, 2006), perbedaan ras, lingkungan serta perbedaan buffer (Evans dan Maxwell, 1987).

Tabel 1. Karakteristik semen segar babi duroc

Karakteristik Semen	Nilai Rataan
Volume semen (mL)	164,75±24,11
Warna semen	Putih susu
pH semen	6,55±17
Bau semen	Khas
Motilitas sperma (%)	70±00
Viabilitas sperma (%)	86,3475±5,12
Konsentrasi x 10 ⁶ sel sperma/mL	370,25±85,89
Abnormalitas sperma (%)	3,4275±0,51
Membran plasma utuh (MPU) sperma (%)	87,3±5,15

Warna semen yang didapatkan selama penelitian dari 4 kali penampungan dari seekor babi duroc adalah putih susu. Hal ini sesuai dengan pendapat Robert (2006) dan Ax *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa karakteristik warna semen babi adalah putih krem. Sumardani (2007) menjelaskan bahwa warna semen berkaitan erat dengan konsentrasi dan kekentalan. Disamping itu warna dan konsistensi semen babi tergantung dari fraksi yang ditampung, yaitu fraksi pra spermatozoa dan fraksi kaya spermatozoa. Menurut Johnson *et al.* (2000) beberapa faktor yang mempengaruhi warna semen adalah tingkat rangsangan, frekuensi ejakulasi, kualitas pakan.

Derajat keasaman (pH) semen yang didapatkan selama penelitian ini adalah pH 6,5±17. Hasil penelitian pH semen masih berada pada kisaran pH semen hasil penelitian Garner dan Hafez (2000) yaitu 6,4-7,8 tetapi lebih rendah dari hasil penelitian Sumardani (2007) yaitu 7,78. Faktor-faktor yang mempengaruhi perubahan pH tersebut terjadi karena umur, tingkat rangsangan, frekuensi ejakulasi, lingkungan dan kualitas pakan (Feradis, 2010). Semakin rendah atau semakin tinggi dari pH normal, dapat membuat spermatozoa lebih cepat mati (Sumardani, 2007).

Motilitas spermatozoa dinilai segera sesudah penampungan. Dari hasil pengamatan semen segar secara mikroskopik diperoleh rata-rata motilitas spermatozoa 70±00%. Hasil penelitian ini tergolong rendah bila dibandingkan dengan penelitian Feka *et al.* (2016) yang mendapatkan motilitas mencapai 89,00% dan Yusuf *et al.* (2017) memperoleh motilitas sebesar 76,31%. Meskipun demikian hasil ini masih dalam kategori normal, hal ini sesuai menurut Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan standar minimum kualitas semen yang dipakai untuk inseminasi buatan memiliki

motilitas 50-80%. Faktor-faktor yang memengaruhi motilitas spermatozoa adalah perbedaan bangsa, individu, umur ternak yang digunakan (Johnson *et al.*, 2000).

Viabilitas yang diperoleh dari hasil evaluasi semen dengan rata-rata 86,3475. Hasil penelitian ini kategori tinggi bila dibandingkan dengan penelitian Kaka (2020) yang mendapatkan viabilitas 71,67±5,85%.

Penilaian konsentrasi semen sangat esensial karena faktor inilah yang menggambarkan jumlah spermatozoa yang terkandung dalam satu ejakulasi. Rataan konsentrasi spermatozoa yang diperoleh yaitu 370,25±85,89 sel/mL, hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian Feka *et al.* (2016) yang hanya memperoleh konsentrasi 280,20 x 10⁶ sel/mL. Namun demikian hasil ini masuk kategori normal sesuai dengan hasil penelitian Garner dan Hafez (2000), yakni karakteristik semen babi salah satunya adalah memiliki kisaran konsentrasi 130-300 x 10⁶ se/mL.

Dari penelitian yang dilakukan terhadap semen segar babi duroc yang dievaluasi secara mikroskopik didapatkan persentase abnormalitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini tergolong rendah dan masih memenuhi kriteria untuk diolah menjadi semen beku yaitu dengan persyaratan sperma abnormal < 20% (Hafez, 2000). Bentuk abnormal spermatozoa pada penelitian ini kebanyakan abnormalitas skunder seperti ekor bergulung, leher patah, kepala dan leher putus. Abnormalitas skunder disebabkan perlakuan ketika pembuatan preparat ulas (Solihati *et al.*, 2008).

Hasil perhitungan rata-rata nilai MPU pada semen segar babi duroc adalah 87,3±5,15%. Hasil penelitian ini tergolong tinggi bila dibandingkan dengan penelitian Sangma *et al.* (2020) yang memperoleh persentase MPU pada

babi hampshire sebesar 81,74±0,45%. Perbedaan nilai MPU spermatozoa antar ternak dapat dipengaruhi oleh perbedaan individu ternak, pola pemeliharaan, dan kandungan pengencer (Lubis *et al.*, 2013). Keutuhan membran plasma dapat memengaruhi kondisi tudung akrosom, pengamatan MPU sangat penting karena dapat menentukan kualitas dan kemampuan fertilitas spermatozoa (Sutama *et al.*, 2000).

Berdasarkan hal tersebut, karakteristik semen segar babi duroc yang diperoleh memiliki kualitas yang baik. Hal ini dapat disimpulkan

bahwa semen layak diproses lebih lanjut baik dalam bentuk semen cair maupun semen beku.

Pengaruh Perlakuan Terhadap Motilitas Spermatozoa

Widiastuti (2001) mengatakan bahwa motilitas atau daya gerak spermatozoa digunakan sebagai penilaian kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur, oleh karena itu motilitas mempunyai peranan yang penting dalam proses fertilisasi. Motilitas spermatozoa ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap motilitas spermatozoa

Variabel	Waktu ekuilibrasi (Jam)		
	1	2	3
Pasca pengenceran	70±00 ^a	70±00 ^a	70±00 ^a
Pasca ekuilibrasi	64,37±3,75 ^a	63,12±3,14 ^a	63,12±3,14 ^a
Pasca thawing	20±1,53 ^{ab}	23,12±2,39 ^b	16,87±3,75 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan (P>0,05)

Berdasarkan hasil analisis statistik, perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata (P > 0,05) terhadap kualitas spermatozoa pasca pengenceran dan pasca ekuilibrasi.

Nilai motilitas pasca pengenceran pada semua perlakuan adalah 70±00%, setelah ekuilibrasi terjadi penurunan nilai motilitas spermatozoa sebesar 5,625% pada P1, 6,875% pada P2 dan P3. Sugiarti *et al.* (2004) menyatakan bahwa proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme spermatozoa yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH. Kondisi tersebut menyebabkan perubahan kondisi asam yang bersifat toksik bagi spermatozoa. Meskipun demikian penurunan motilitas ini masih dalam kisaran normal motilitas yakni 50-80%. Hasil ini sesuai yang dilaporkan Aminasari (2009) yang menyatakan bahwa nilai motilitas spermatozoa yang sudah didinginkan pada suhu 5°C tidak boleh berada dibawah 50%.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi memberikan perbedaan nyata (P < 0,05) terhadap motilitas spermatozoa babi duroc setelah pembekuan. Waktu ekuilibrasi 2 jam menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05) antara waktu ekuilibrasi 3 jam dan 1 jam.

Setiap peningkatan waktu dan penurunan suhu penyimpanan, dari suhu ekuilibrasi ke suhu

pembekuan (5°C ke -190°C) terlihat bahwa motilitas spermatozoa semakin menurun. Pada P1 terjadi penurunan motilitas sebesar 44,375%, P2 40%, dan P3 sebesar 46,25%. Dari ketiga penurunan angka motilitas tersebut, terlihat bahwa penurunan persentase motilitas terendah teramati pada perlakuan ekuilibrasi 2 jam.

Persentase penurunan terendah pada perlakuan ekuilibrasi 2 jam mengindikasikan bahwa pada waktu tersebut gliserol telah mencapai keseimbangan yang optimal dengan spermatozoa babi duroc untuk menyesuaikan dengan pengencer Tris kuning telur-modifikasi, spermatozoa memberi kesempatan yang optimal terhadap gliserol untuk masuk kedalam membran plasma spermatozoa. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda yang dilaporkan oleh Yi *et al.* (2002) yang menyatakan waktu ekuilibrasi 2 atau 3 jam merupakan waktu yang cocok untuk pembekuan spermatozoa babi dan Passarelli *et al.* (2020) melaporkan bahwa ekuilibrasi 2 jam dengan nilai motilitas sebesar 26,16% pada babi hibrida komersil.

Sedangkan penurunan pada perlakuan ekuilibrasi 1 jam mengindikasikan bahwa gliserol belum dapat dimanfaatkan sebagai krioprotektan sel karena waktu pemaparan yang kurang optimum dan penurunan pada perlakuan ekuilibrasi 3 jam diduga terjadi karena pemaparan gliserol yang terlalu lama dengan spermatozoa sehingga menimbulkan efek yang merugikan bagi spermatozoa. Hal ini sesuai

yang dilaporkan Umar dan Maharani (2005) yang menyatakan bahwa ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan toksik terhadap sel spermatozoa. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Toelihere (1993) pemaparan gliserol yang terlalu lama dapat bersifat toksik sehingga akan menyebabkan gangguan motilitas. Sebaliknya, efek toksik gliserol dapat diminimalisir dengan mempersingkat waktu pemaparan. Namun, efek pemaparan gliserol yang singkat tidak memberikan kesempatan kepada gliserol untuk berdifusi kedalam sel spermatozoa.

Penurunan persentase motilitas ini juga terjadi menurut Sugiarti *et al.* (2004) disebabkan penyimpanan spermatozoa dalam rentang waktu yang lama akan mengakibatkan penurunan motilitas akibat adanya asam laktat sisa dari metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menurun menjadi asam akibat penurunan pH.

Penurunan persentase motilitas pada waktu ekuilibrasi menurut Salisbury dan Van Denmark (1985) bahwa tenaga yang dibutuhkan spermatozoa berasal dari perombakan ATP (Adenosin Trisphosphate) yang berada di dalam selubung mitokondria teraktifkan oleh enzim tertentu sehingga ikatan fosfat yang mengandung banyak energi terurai dan melepaskan energi, akan tetapi penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin dan terlalu lama membuat membran spermatozoa rusak dan menyebabkan enzim untuk merombak ATP

hilang sehingga mengakibatkan motilitas yang rendah pada spermatozoa. Hal serupa juga dilaporkan oleh Colenbrander *et al.* (1992) menyatakan bahwa kerusakan membran plasma menyebabkan terlepasnya enzim aminotransferase (AspaT) kedalam plasma semen, sehingga produksi ATP akan terhenti dan menyebabkan spermatozoa tidak dapat bergerak.

Selain itu, penurunan persentase motilitas juga terjadi karena pada suhu ruang terjadi proses peroksidasi yaitu reaksi oksidatif yang berasal dari adanya deaminasi asam amino oleh enzim aromatic amino acid aminase (AAAO). Enzim ini akan meningkat seiring meningkatnya suhu penyimpanan (Vishwanath and Shannon, 2000). Enzim AAAO ini tidak aktif pada spermatozoa yang masih hidup, tetapi aktif pada spermatozoa yang mati, sehingga semakin banyak spermatozoa yang mati meningkatkan produksi enzim AAAO dan bersifat toksik bagi spermatozoa hidup.

Pengaruh Perlakuan Terhadap Viabilitas Spermatozoa

Toelihere (1993) pada waktu semen dicampur dengan zat warna, sel-sel spermatozoa yang hidup tidak atau sedikit sekali menghisap zat warna sedangkan sel-sel yang mati akan mengambil warna karena permeabilitas dinding sel meninggi waktu mati. Viabilitas spermatozoa ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap viabilitas spermatozoa post thawing

Variabel	Waktu ekuilibrasi (Jam)		
	1	2	3
Pasca pengenceran	86,20±5,30 ^a	86,20±5,30 ^a	86,20±5,30 ^a
Pasca ekuilibrasi	85,15±7,13 ^a	79,97±6,78 ^a	80,13±2,35 ^a
Pasca thawing	42,17±0,35 ^{ab}	45,44±3,29 ^b	36,79±7,41 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan ($P > 0,05$)

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap spermatozoa pasca pengenceran dan pasca ekuilibrasi.

Nilai viabilitas sperma pasca pengenceran untuk waktu ekuilibrasi 1, 2, 3 jam adalah sebesar 86,20±5,30%. Setelah ekuilibrasi terjadi penurunan viabilitas spermatozoa sebesar 1,05% pada P1, 6,235% P2, dan 6,067% P3. Penurunan persentase viabilitas ini masih dalam kisaran normal yaitu >80% (Ax *et al.*, 2000). Kemudian Kostaman dan Utama (2006) menyatakan bahwa persentase viabilitas

spermatozoa lebih tinggi dari pada motilitas spermatozoa karena dari jumlah spermatozoa yang hidup belum tentu semua motil progresif.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap viabilitas spermatozoa babi duroc pasca thawing. Namun, pada uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi 2 jam berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan waktu ekuilibrasi 3 jam dan 1 jam.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa tertinggi 45,44±3,29% terdapat pada perlakuan

ekuilibrase 2 jam. Hasil ini tergolong rendah bila dibandingkan dengan hasil penelitian Dapawole *et al.* (2017) yang memperoleh persentase viabilitas sebesar $69,17 \pm 3,62\%$. Waktu ekuilibrase 2 jam gliserol sudah dapat dimanfaatkan sebagai krioprotektan sel. Efek perlindungannya adalah menjaga keseimbangan elektrolit intraseluler dan ekstraseluler sehingga proses biokimia yang terjadi di dalam sel spermatozoa tetap berlangsung dan mengurangi kematian sel spermatozoa yang berlebihan. Gliserol akan berdifusi, menembus dan memasuki spermatozoa dan akan dipakai oleh spermatozoa untuk metabolisme oksidatif-elektrolit intraseluler serta mengurangi daya rusaknya terhadap sel spermatozoa (Toelihere, 1993).

Selain itu, gliserol akan menurunkan konsentrasi natrium di dalam medium diluar sel sehingga kematian spermatozoa akibat solution-effect dapat dihindarkan dan pembentukan kristal es di dalam sel dapat dikurangi. Mekanisme kerjanya adalah dengan jalan mengubah bentuk dan ukuran kristal es yang terbentuk sehingga mengurangi tekanan mekanik dan menurunkan titik beku medium sehingga kristal-kristal es tidak terbentuk. Solution-effect ini akan timbul bila terjadi perubahan yang drastis dari larutan dalam sel yang dibekukan sebagai akibat terbentuknya kristal es di luar dan dalam sel, perubahan air menjadi es dan adanya peningkatan konsentrasi larutan di dalam dan di luar sel. Membran plasma pada kondisi seperti ini menunjukkan kestabilan fungsi yang baik sehingga tidak mudah ditembus oleh zat warna pada saat uji viabilitas spermatozoa (Anggarsari, 2015)

Disisi lain, nutrisi yang terdapat dalam pengencer Tris-kuning telur dan antioksidan yang terkandung dalam minyak zaitun dapat meningkatkan ketahanan membran plasma spermatozoa, sehingga membran plasma berfungsi secara maksimal untuk melindungi organel-organel sel dan mengatur tekanan osmosis selama proses metabolisme berlangsung. Kandungan antioksidan pada minyak zaitun yang ditambahkan ke dalam pengencer dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa.

Penambahan antioksidan minyak zaitun dalam pengencer dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif, dan akhirnya berpengaruh pada kelangsungan hidup spermatozoa. Hal ini diperkuat oleh Mittal *et al.*

(2010) dimana kematian sel spermatozoa atau yang disebut apoptosis dapat terjadi apabila tidak ada perlindungan antioksidan. Menurut Zhenganddan Wang (2009) mekanisme hambatan dari antioksidan biasanya terjadi pada saat reaksi-reaksi inisiasi atau propagasi pada reaksi oksidasi lemak atau molekul lainnya di dalam tubuh dengan cara menyerap dan menetralsir radikal bebas. Kemudian Al-Daraji (2012) menyatakan bahwa suplementasi minyak zaitun menghasilkan viabilitas lebih baik dibandingkan tanpa minyak zaitun.

Hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa nilai viabilitas spermatozoa terendah $36,79 \pm 7,41\%$ terdapat pada perlakuan ekuilibrase 3. Waktu ekuilibrase yang lama kemungkinan membuat gliserol menjadi toksik sehingga membuat kerusakan pada membran plasma spermatozoa dan menyebabkan viabilitas spermatozoa rendah (Apriyanti, 2012). Gliserol akan menarik air secara berlebihan dari dalam sel spermatozoa yang menyebabkan dehidrasi dan selanjutnya terjadi kerusakan sel spermatozoa (Best, 2006).

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa mungkin disebabkan oleh kondisi membran plasma spermatozoa yang telah rusak. Membran plasma spermatozoa berfungsi sebagai penjaga organel sel dan pengatur keseimbangan elektrolit dalam metabolisme (Salmah, 2014). Apabila membran plasma mengalami kerusakan membuat metabolisme spermatozoa terganggu dan spermatozoa kehilangan kemampuan fertilitasnya dikarenakan komponen seluler lepas dan kehilangan daya inaktivasi komponen protein enzim penting di dalam akrosom. kejadian ini membuat spermatozoa mengalami kematian dan akan berdampak pada viabilitas spermatozoa (Yulnawati dan Agus, 2005).

Pengaruh Perlakuan Terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Ada dua macam abnormalitas spermatozoa menurut Partodihardjo (1992) yaitu abnormalitas primer yang meliputi kelainan seperti kepala terlalu kecil, kepala terlalu besar, kepala kerucut, kepala miring, kepala dua, kepala salah bentuk, berleher besar, sedangkan abnormalitas sekunder meliputi kepala terpisah dari leher, leher patah, ekor kusut, ekor patah dan ekor tergulung. Abnormalitas spermatozoa ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh waktu ekuilibrisasi terhadap abnormalitas spermatozoa

Variabel	Waktu ekuilibrisasi (Jam)		
	1	2	3
Pasca pengenceran	3,67±0,49 ^a	3,67±0,49 ^a	3,67±0,49 ^a
Pasca ekuilibrisasi	4,11±0,52 ^a	3,84±0,36 ^a	3,88±0,33 ^a
Pasca thawing	8,19±0,38 ^a	4,65±0,36 ^b	7,64±0,84 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan (P>0,05)

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan perlakuan tidak memberikan pengaruh ($P > 0,05$) nyata terhadap kualitas spermatozoa pasca pengenceran dan pasca ekuilibrisasi, dimana memiliki nilai sebesar 3,67±0,49%. Setelah ekuilibrisasi terlihat adanya peningkatan abnormalitas spermatozoa sebesar 0,4375% pada ekuilibrisasi 1 jam, 0,1675% pada ekuilibrisasi 2 jam dan 2,075% pada ekuilibrisasi 3 jam. Persentase abnormalitas spermatozoa yang semakin meningkat pada setiap tahapan perlakuan dipengaruhi oleh perlakuan pada saat pencampuran semen, pembuatan preparat (Wiratri *et al.*, 2014). Namun demikian, peningkatan abnormalitas ini masih dalam kisaran normal karena menurut Johnson *et al.* (2000) abnormalitas spermatozoa tidak melebihi 20%.

Hasil analisis statistik yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa P2 memberikan perbedaan nyata ($P < 0,05$) pada P3 dan P1 terhadap abnormalitas spermatozoa babi duroc pasca thawing.

Peningkatan abnormalitas spermatozoa terendah pasca thawing dari pasca ekuilibrisasi didapati pada perlakuan ekuilibrisasi selama 2 jam dengan penurunan persentase sebesar 0,81% dibandingkan pada perlakuan ekuilibrisasi selama 1 jam dan 3 jam yang memperoleh peningkatan abnormalitas sebesar 4,0775% dan 3,755%. Persentase abnormalitas yang diperoleh dalam penelitian ini jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan penelitian Bebas *et al.* (2020) memperoleh persentase viabilitas sebesar 27,60±1,14%.

Perbedaan persentase abnormalitas spermatozoa pada setiap perlakuan dikarenakan dalam larutan pengencer keseimbangan intraseluler dan ekstraseluler dengan spermatozoa tidak stabil karena adanya penurunan suhu pada saat ekuilibrisasi (Tuhi *et*

al., 2013). Hal ini diperkuat oleh Herdiawan (2004) perbedaan konsentrasi cairan intarseluler dengan ekstraseluler akan menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga akan menyebabkan selubung lipoprotein pecah dan membran sel mengalami kerusakan, kondisi inilah yang dapat menyebabkan spermatozoa abnormal.

Perbedaan laju pembekuan spermatozoa pada media berbeda akan berpengaruh pada tingkat abnormalitas spermatozoa sebagai akibat terjadinya perubahan fisik media hidupnya, baik perubahan tekanan osmotik, maupun pembentukan kristal-kristal es intraseluler. Hal tersebut dapat membuat struktur pada spermatozoa berubah seperti bentuk spermatozoa ekor tergulung atau kepala terlepas (Siregar, 2018). Abnormalitas spermatozoa terjadi karena adanya suhu dingin dan tekanan osmotik yang tidak seimbang akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama masa penyimpanan pada suhu 5°C. Hal ini diperkuat oleh Solihati dan Kune (2009) yang menyatakan bahwa meningkatnya abnormalitas pada spermatozoa dipengaruhi oleh lamanya waktu penyimpanan. Kemudian ditambahkan Arifiantini *et al.* (2006) peraparasi, cold shock, genetik, stres, suhu lingkungan, penyakit dan bahkan perlakuan pada saat pembekuan semen dapat mempengaruhi tingkat abnormalitas spermatozoa.

Pengaruh Perlakuan Terhadap Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa

Fungsi keutuhan membran plasma spermatozoa adalah sebuah faktor penting dalam metabolisme spermatozoa, kapasitas, reaksi akrosom, dan pengikatan spermatozoa pada permukaan sel telur (Baqir *et al.*, 2009). MPU spermatozoa ditampilkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap MPU spermatozoa

Variabel	Waktu ekuilibrasi (Jam)		
	1	2	3
Pasca pengenceran	86,92±5,18 ^a	86,92±5,18 ^a	86,92±5,18 ^a
Pasca ekuilibrasi	86,25±6,83 ^a	81,06±7,926 ^a	81,09±2,57 ^a
Pasca thawing	42,67±0,43 ^{ab}	50,15±4,82 ^b	37,73±7,27 ^a

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar perlakuan (P>0,05)

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan tidak memberikan pengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap kualitas spermatozoa pasca pengenceran dan pasca ekuilibrasi.

Hasil pemeriksaan MPU spermatozoa pasca pengenceran untuk waktu ekuilibrasi 1, 2, dan 3 jam menunjukkan nilai sebesar 86,92±5,18%. Terlihat adanya penurunan persentase MPU setelah ekuilibrasi sebesar 0,6675% pada P1, 5,8625% pada P2, dan 5,825% pada P3. Penurunan MPU terendah terdapat pada P1, kemudian diikuti P3 dan P2. Kondisi ini menggambarkan bahwa semakin lama waktu penyimpanan menyebabkan MPU spermatozoa semakin menurun. Hal ini berkaitan dengan spermatozoa babi sangat sensitiv terhadap temperatur dingin yang biasa disebut cold shock (Holt, 2000; Watson, 2000).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi memberikan perbedaan nyata ($P < 0,05$) terhadap P2 dan P3 membran plasma utuh spermatozoa babi duroc pasca thawing.

Nilai MPU tertinggi pasca thawing terdapat pada perlakuan ekuilibrasi 2 jam yaitu 50,15±4,82% dengan penurunan nilai MPU terendah sebesar 30,9025%, kemudian diikuti P3 dan P1 dengan besar angka penurunan masing-masing 43,3629% dan 43,585%. Perolehan nilai MPU dalam penelitian ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Bebas *et al.* (2020) yang memperoleh persentasi MPU sebesar 53,80±3,36%. Persentasi MPU tertinggi pada P2 dalam penelitian ini menunjukkan bahwa gliserol dalam pengencer Tris-modifikasi sudah dapat beradaptasi dengan membran sel spermatozoa, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen protektif, sumber energi dan kandungan antioksidan dalam minyak zaitun mampu memutuskan rantai reactive oxygen species (ROS) selama penyimpanan pada suhu dingin.

Penggunaan pengencer Tris (Hydroxymethyl) aminomethane sebagai buffer berperan untuk memertahankan tekanan osmosis

dan keseimbangan elektrolit (Siswanto, 2006) dan dikenal sebagai penyangga yang baik (Steinbach and Foote, 1992). Kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Umumnya kuning telur ditambahkan ke dalam pengencer semen sebagai sumber energi, agen protektif, dan dapat memberikan efek sebagai penyangga terhadap sperma (Watson and Martin, 1975). Kuning telur juga mengandung glukosa, vitamin yang larut dalam air dan larut dalam lemak sehingga menguntungkan spermatozoa (Salisbury dan Van Denmark, 1985). Disisi lain, kandungan lesitin (phosphatidil choline) pada kuning telur mampu melindungi dan menjaga keutuhan membran sel spermatozoa (Moussa *et al.*, 2002).

Penurunan nilai MPU pasca thawing dengan waktu ekuilibrasi selama 1 jam disebabkan gliserol dan bahan pengencer yang digunakan belum optimal digunakan sebagai krioprotektan dan sumber nutrisi bagi spermatozoa. Sedangkan penurunan persentasi MPU pada waktu ekuilibrasi 3 jam disebabkan oleh efek racun dari krioprotektan gliserol dan energi telah habis terpakai.

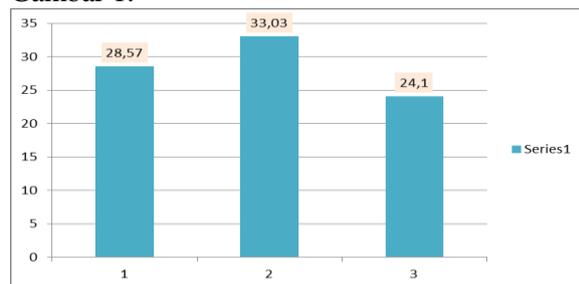
Menurut Umar dan Maharani (2005) ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak gliserol dengan spermatozoa berlebihan sehingga bersifat toksik terhadap sel spermatozoa. Kemudian ditambahkan Mc Laughin *et al.* (1992) mengemukakan bahwa efek toksisitas dari gliserol adalah memodifikasi struktur membran plasma dan pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat metabolisme energi.

Faktor yang memengaruhi penurunan nilai MPU juga disebabkan tingginya metabolisme seluler yang menggunakan banyak energi di dalam plasma semen babi duroc untuk mempertahankan kondisi intraseluler terhadap perubahan suhu, dimana lama berada pada suhu ruang mengakibatkan terjadinya kerusakan membran plasma. Perubahan suhu dapat memicu

stress pada spermatozoa yang berdampak pada terjadinya perubahan konfigurasi fosfolipid membran plasma, adanya disfungsi dan permeabilitas membran sel.

Pengaruh Perlakuan Terhadap Recovery Rate Spermatozoa

Recovery rate adalah kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa setelah thawing dengan motilitas spermatozoa segar (Hafez, 2000). Recovery rate spermatozoa ditampilkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh perlakuan terhadap recovery rate spermatozoa

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan tidak memberikan pengaruh ($P > 0,05$) terhadap recovery rate spermatozoa pasca thawing, namun pada uji lanjut waktu ekuilibrasi 2 jam berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan waktu ekuilibrasi 1 jam dan 3 jam.

Adanya perbedaan nilai recovery rate yang nyata pada P2 dengan perlakuan lainnya menunjukkan bahwa waktu ekuilibrasi 2 jam merupakan waktu yang optimum bagi spermatozoa untuk beradaptasi dengan pengencer pembekuan semen sehingga pada tahap pembekuan dan thawing, spermatozoa masih terjaga. Tingkat kerusakan spermatozoa yang teramati dalam penelitian ini berbeda dengan yang dilaporkan Hafez (2000) bahwa spermatozoa yang dibekukan akan mengalami kerusakan sekitar 40%.

Menurut Alvarez and Storey (1982) kerusakan sel selama proses pembekuan dan thawing disebabkan karena terjadinya

peroksidasi lipid pada spermatozoa sehingga menurunkan daya hidup. Dilanjutkan Park and Graham (19932) kerusakan pertama pada membran sel spermatozoa terjadi pada proses pembekuan dan thawing antara suhu -15°C sampai -60°C tetapi tidak terjadi selama penyimpanan di nitrogen cair. Pendinginan dan pemanasan kembali akan merusak lipoprotein yang ada pada membran plasma sperma.

Campbell *et al.* (2003) melaporkan persentase sperma motil pasca thawing minimal 30% untuk dapat diinseminasikan. Berdasarkan teori ini semen beku babi duroc yang dihasilkan pada penelitian ini tidak layak digunakan untuk IB. Hal ini diduga disebabkan substansi yang terdapat dalam kuning telur dapat menghambat respirasi dan mengurangi persentase sperma motil (Moussa *et al.*, 2002). Substansi yang dibutuhkan sperma dari kuning telur dalam kriopreservasi adalah Low Density Lipoprotein (LDL). Low Density Lipoprotein ini didapatkan melalui ultrasentrifugasi. Namun kuning telur yang digunakan dalam penelitian ini adalah seluruh komponen lipoprotein (LDL dan high density lipoprotein (HDL) yang dapat menghambat respirasi dan motilitas spermatozoa.

Arifiantini *et al.* (2005) melaporkan bahwa nilai RR semen beku pada tiga jenis pengencer TF, Tris-kuning telur dan pengencer paten Andromed masing-masing sebesar 59,40%, 63%, 48%, dan 69,96%. Sedangkan Komariah *et al.* (2013) melaporkan nilai RR semen beku pada tiga bangsa sapi Limousin, Simental, dan FH masing-masing sebesar 58,87%, 56,27% dan 58,87%.

Perbedaan nilai RR yang diperoleh dan penurunan nilai RR yang melebihi batas normal ini kemungkinan disebabkan karena ternak babi mempunyai lipid penyusun membran plasma yang rasionya lebih rendah dari membran plasma sperma sapi. Hal ini yang menyebabkan sperma babi lebih rentan terhadap cold shock selama penyimpanan pada suhu rendah dan lebih peka terhadap serangan reactive oxygen spesies (ROS).

SIMPULAN

Penelitian ini menyimpulkan bahwa waktu ekuilibrasi dua jam dalam pengencer Tris-

modifikasi menghasilkan kualitas semen beku babi duroc yang lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla EME, Terada T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Agroland* 16 (2): 172-179.
- Al-Daraji HJ. 2012. Adding olive oil to rooster semen diluents for improving semen quality and storage ability during liquid storage. *Baltic journal of comparative and clinical system biology*. 6 (10): 3–11.
- Alvarez JG, Storey BT. 1982. Spontaneous lipid peroxidation rabbit epididymal spermatozoa: It's effect on sperm motility. *Biol. Reprod* 27 (5): 1102–1108.
- Aminasari PD. 2009. Pengaruh umur terhadap kualitas semen beku sapi limousin. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang.
- Anggarsari LY. 2015. Pengaruh waktu ekuilibriasi terhadap motilitas dan viabilitas kambing boer after thawing dalam pengencer yang mengandung lesitin nabati. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Apriyanti C. 2012. pengaruh waktu ekuilibriasi terhadap kualitas semen beku sapi pesisir pre dan post thawing. *Thesis*. Program Studi Ilmu Ternak Universitas Andalas.
- Arifiantini RI. 2005. Penentuan waktu ekuilibriasi pada pembekuan semen kuda menggunakan bahan pengencer susu skim. *J. Anim. Prod.* 9(3): 145-152.
- Arifiantini RI, Yusuf TL. 2006. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi FH. *Majalah Ilmiah Peternakan* 9(3): 89-93.
- Arruda SP, Ball BA, Gravance CG, Gracia AR, Liu IKM. 2002. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology* 58(4): 253-256.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME. 2000. Semen evaluation. In: ESE Hafez & B Hafez (Eds). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Williams & Wilkins, USA.
- Barrios BR, Perez-Pe, Gallego M, Tato A, Muin, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrian Perez A.. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology reproduction* 63(5): 1531-1537.
- Bebas W, Gorda W. 2020. Kadar krioprotektan gliserol dan dymethilsulfoxide terbaik pada pengencer astaxanthin fosfat kuning telur bebek terhadap kualitas semen beku babi. *Jurnal Veteriner* 2(1): 115-123.
- Best B. 2006. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryonics. *Animal Reproduction Science* 60: 41-51.
- Baqir M, Fakhrildin MR, Kouty BK. 2009. Outcomes of sperm parameters, hyposmotic swelling test and intra-uterine insemination for varicocelic and non – varicocelic infertile patients. *Jurnal Dohuk University* 12(1): 301-305.
- Campbell JR, Campbell KL, Kenealy MD. 2003. Artificial insemination. In: *Anim Sci*. 4th Ed New York (US): Mc Graw Hill. Page. 219-224.
- Colenbrander B, Fazeli AR, Van Buiten A, Parlevliet J, Gadella MB. 1992. Assesment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Act. Vet. Scand. Supl.* 88: 49-58.
- Dapawole RR, Arifiantini RI, Nalley WM. 2017. Kualitas Semen Beku Babi dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi dengan Trehalosa. *Jurnal veteriner Indonesia*. *Jurnal Veteriner* 18 (1): 69-75.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination Of Sheep And Goat*. Butterworths, Sydney.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Alfabeta. Bandung.
- Feka WV, Dethan AA, Beyleto VY. 2016. Pengaruh lama penyimpanan terhadap viabilitas dan ph semen babi landrace yang diencerkan menggunakan bahan pengencer sitrat kuning telur. *Journal of Animal Science* 1(3): 34-35.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: ESE Hafez & B Hafez (Eds). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Williams & Wilkins, USA.
- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in farm animals*. Edisi Ke-7. Lippincot. Williams and Wilkins. USA. Hlm. 140–141.

- Herdiawan. 2004. Pengaruh Laju Penurunan Suhu dan Jenis Pengencer terhadap Kualitas Semen Beku Domba Periang. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 9(2): 98-107.
- Hoesni F. 1997. Pengaruh kadar kuning telur dalam berbagai pengencer terhadap kualitas semen spermatozoa pasca pembekuan. *Tesis*. Program Pasca Sarjana. Universitas Padjajaran. Bandung.
- Holt WV. 2000. Basic aspect of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62(3): 3-22.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62(3): 143-172.
- Kaka A. 2020. Karakteristik dan daya fertilitas spermatozoa babi peranakan landrace. *Jurnal Peternakan Indonesia* 22(3): 277-283.
- Kartasudjana R. 2001. Teknik inseminasi buatan. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Komariah, Arifiantini RI, Nugraha FW. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin dan friesian holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan* 37(3): 143-147.
- Kostaman T, Utama IK. 2006. Studi motilitas dan daya hidup spermatozoa kambing boer dalam pengencer Tris sitrat fruktosa. *J. Sain Vet.* 24(1): 58-64.
- Kusumaningrum DA, Situmorang P, Setioko AR, Sugiarti T, Triwulangningsih, Sianturi RG. 2002. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap daya hidup spermatozoa entog. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- Lubis TM, Dasrul CNT, Akbar T. 2013. Efektivitas penambahan vitamin c dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap kualitas spermatozoa kambing boer setelah penyimpanan dingin. *Jurnal S. Pertania.* 3(1): 347-361.
- Mc Laughin EA, Ford WCL, Hull MGR. 1992. Motility characteristics and membran integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Reprod.* 95(5): 527-534.
- Mittal P, Gupta V, Kaur G, Garg AK, Singh A. 2010. Phytocimistry and pharmacological activities of psidium guajava. A review. *IJPSR.* 1(9): 9-19.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen thawed bull semen. *Theriogenology* 57 (6): 1695-1706.
- Park JE, Graham K. 1992. Flavanoid composition and effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38(2): 209-222.
- Passarelli MDS, Pinoti Pavaneli AP, Mouro Ravagnani G, Pasini Martins M, Pedrosa AC, Maria Massami Kitamura Martins S, Rocha NRDA, Bittarigo VH, Yasui G, Yeste M, de Andrade AFC. 2020. Effects of different equilibration times at 5°C on boar sperm cryotolerance. *Animal reproduction science* 219(1): 106-547.
- Robert VK. 2006. Semen Processing, Extending And Storage For Artificial Insemination In Swine. Dep. of animal science University of Illinois. Hlm. 1-7.
- Partodihardjo F. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Penerbit Mutiara, Cet. Ke-3. Jakarta.
- Salisbury GW, Van Denmark. 1985. Fisiologi Reproduksi Dan Inseminasi Buatan Pada Ternak Sapi (Terjemahan RD Januar). Gaja Mada Universitas Press. Yogyakarta.
- Salmah N. 2014. Motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa semen beku sapi bali pada pengencer andromed dan Tris kuning telur. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Hasanudin Makasar.
- Sangma TFM, Ahmed K, Choudhury M, Zaman GU, Ahmed N, Das, A. 2020. Characteristics of fresh crossbreed hampshire boar semen. *Haryana veteriner* 59 (1): 98-101.
- Siswanto. 2006. Kualitas Semen di dalam pengencer tris dan natrium sitrat dengan berbagai sumber karbohidrat dan level gliserol pada proses krioprservasi semen rusa timor (*Cervus timorensis*). *Tesis*. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Siregar FK. 2018. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen sapi pesisir sebelum proses pembekuan. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Andalas Padang.
- Solihati Idi NR, Rasad SD, Rizal M, Fitriani M. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, Tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *Jurnal Animal Production* 10(1): 22-29.
- Solihati Idi NR, Kune P. 2009. Pengaruh jenis pengencer terhadap motilitas dan daya

- tahan hidup spermatozoa semen cair sapi simental. Makalah seminar nasional.
- Steinbach J, Foote RH. 1992. Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen bovine spermatozoa. *Journal of Dairy Science* 50 (2): 205–213.
- Sugiarti T, Triwulangningsih E, Situmorang P, Dianturi RG, Kusumaningrum DA. 2004. Penggunaan katalase dalam produksi semen dingin sapi. Prosiding seminar nasional teknologi peternakan dan veteriner. Hlm. 215–220.
- Sumardani NLG. 2007. Viabilitas dan fertilitas spermatozoa dalam pengenceran BTS dan Zorlesco dengan penyimpanan berbeda dalam rangkaian inseminasi buatan pada babi. *Tesis*. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Sutama IK, Setiadi B, Situmorang P, Adiati U, Budiarsana IGM, Kostaman T, Maulana, Mulyawan, Riad S. 2000. Uji kualitas semen beku kambing peranakan etawah dan kambing boer. Laporan Bagian Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan ARMP II. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- Tambing SN, Toelihere MR, Yusuf TL, Sutama IK. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing peranakan etawah. *JITV* 5(2): 84-99.
- Toelihere MR. 1993. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa. Bandung. Hlm. 22.
- Tuhu AD, Ondho YS, Samsudewa D. 2013. Pengaruh perbedaan waktu pelepasan water jacket dalam proses ekuilibriasi terhadap kualitas semen beku sapi jawa pada tahap before freezing dan post thawing. *Jurnal Animal Agricultural* 2(1): 473.
- Umar S, Maharani M. 2005. Pengaruh berbagai waktu ekuilibriasi terhadap daya tahan sperma sapi limousin dan uji kebuntingan. *Jurnal agribisnis peternakan* 1(1): 17-21.
- Vishwanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal reproduction science* 62(1): 23-53.
- Watson PF, Martin CA. 1975. The Influence of some Fractions of Egg Yolk on the Survival of Ram Spermatozoa at 5°C. *Australian journal of biological sciences* 28 (2): 145-152.
- Wiratri VDB, Susilawati T dan Wahyuningsih S. 2014. Kualitas semen sapi Limousin pada pengencer yang berbeda selama pendinginan. *Jurnal Ternak Tropika*. 15(1): 13-20
- Widiastuti E. 2001. Kualitas semen beku sapi FH dengan penambahan antioksidan vitamin C dan E. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yi YJ, Cheon YM, P. C. 2002. Effects of N-acetyl-D-glucosamine and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen thawed boar sperm. *Animal Reproductuon* 69(2): 91-97.
- Yulnawati, Agus SM. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4°C. *Media Kedokteran Hewan* 21(3): 100-104.
- Yusuf TL, Arifiantini RI, Mulyadi Y. 2006. Efektivitas Waktu Pemaparan Gliserol terhadap motilitas spermatozoa pada pembekuan semen domba lokal menggunakan pengencer Tris kuning telur. *Animal production* 8(3): 168-173.
- Yusuf TL, Arifiantini R, Dapawole R, Nalley WM. 2017. Kualitas semen beku babi dalam pengencer komersial yang disuplementasi dengan trehalosa. *Jurnal Veteriner* 18(1): 69-75.
- Zheng W, Wang SY. 2009. Antioxidant activity and phenolics compound in selected herbs. *Jurnal Agric. Food. Chem.* 49(11): 5165-5170.