

PENGARUH PENAMBAHAN BEBERAPA LEVEL GLUTATHIONE DALAM PENGECER AIR KELAPA KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SEMEN SAPI ANGUS

(The effects of adding some levels of glutathione in egg yolk coconut water on the quality of angus bull semen)

Desiderius Salvator Agung¹, Aloysius Marawali^{2*}, Kirenus Uly², F.M.S. Telupere²

¹Mahasiswa Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana

²Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana, Jl. Adisucipto Penfui Kota Pos 104 Kupang 8500 Telp (038) 881580. Fax (0380) 881674

*Correspondent author, email: aloyusmarawali21@gmail.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian untuk mengetahui pengaruh penambahan beberapa level glutathione dalam pengencer air kelapa kuning telur (AK-KT) terhadap kualitas semen sapi angus selama penyimpanan. Materi yang digunakan adalah semen segar dari satu ekor sapi angus berumur 3 tahun yang memiliki kualitas baik. Semen yang berkualitas baik diencerkan dengan pengencer AK-KT dengan penambahan glutathione pada level : 0 % (P0), 0,1% (P1), 0,2% (P2), dan 0,3% (P3). Setelah pengenceran semen disimpan pada suhu 3-5oC. Evaluasi semen pasca pengenceran dilakukan setiap 24 jam penyimpanan terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa. Data penelitian dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan level glutathione 0,2% (P2) mempunyai kualitas terbaik ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan lainnya, yaitu dengan motilitas ($47,00 \pm 2,09\%$), viabilitas ($57,64 \pm 3,08\%$), abnormalitas ($6,20 \pm 1,29\%$) dan daya tahan hidup ($4,00 \pm 0,00$ hari). Disimpulkan bahwa penambahan level glutathione 0,2% dalam pengencer AK-KT memberikan pengaruh terbaik dan lebih efektif dalam mempertahankan kualitas semen cair sapi angus hingga hari ke empat penyimpanan.

Kata-kata kunci: air kelapa, kuning telur, glutathione, semen, sapi angus

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effect of adding several levels of glutathione in egg yolk coconut water dilution (EY-CW) on the quality of angus bull semen during storage. The material used is fresh semen from one 3 years old angus bull that has good quality. Good quality semen was diluted with EY-CW diluent with the addition of glutathione at the levels of 0% (T0), 0.1% (T1), 0.2% (T2), and 0.3% (T3). After dilution, the semen stored at 3-5oC. Evaluation of semen after dilution was carried out every 24 hours of storage for motility, viability, abnormalities and survival of spermatozoa. The research data were analyzed with analysis of variance and continued with the Duncan test. The results showed that the addition of 0.2% glutathione level (T2) had the best quality ($P < 0.05$) compared to other treatments, namely motility ($47.00 \pm 2.09\%$), viability ($57.64 \pm 3.08\%$), abnormality ($6.20 \pm 1.29\%$) and survival (4.00 ± 0.00 days). It was concluded that the addition of a glutathione level of 0.2% in the AK-KT diluent provided the best and more effective influence in maintaining the quality of angus bull liquid semen until the fourth day of storage.

Keywords: coconut water, egg yolk, glutathione, semen, angus bull

PENDAHULUAN

Teknologi inseminasi buatan (IB) telah secara luas dilakukan, tetapi tingkat keberhasilan kebuntingannya masih tergantung pada kualitas semen, disamping faktor manusia seperti

peternak dan inseminator. Upaya mempertahankan kualitas semen dilakukan pengenceran semen menggunakan beberapa bahan pengencer. Beberapa masalah

pengenceran dan terutama penyimpanan semen sudah dapat diatasi dengan melakukan pembekuan semen. Namun selama penerapannya, ada beberapa kendala dalam penggunaan semen beku antara lain keterbatasan persediaan nitrogen cair serta mahalnya prasarana penyimpanan semen beku. Alternatif untuk mengatasi kendala tersebut adalah penggunaan semen cair.

Kualitas semen cair ditentukan oleh bahan pengencer yang digunakan. Ada beberapa jenis bahan pengencer semen alami (organik) yang bisa dijadikan bahan pengencer alternatif salah satunya adalah air kelapa muda. Air kelapa muda memiliki kandungan karbohidrat, mineral, vitamin dan protein. Hal ini menyebabkan air kelapa muda banyak digunakan sebagai pengencer semen. Kandungan bahan-bahan di dalam air kelapa muda dapat menyediakan kebutuhan fisik serta kimiawi spermatozoa sehingga kualitas spermatozoa tetap terjaga (Sulabda dan Puja, 2010). Air kelapa mampu memberikan sumber energi untuk spermatozoa (Mere, 2016), akan tetapi air kelapa tidak dapat melindungi spermatozoa pada temperatur rendah, sehingga butuh penambahan kuning telur yang berfungsi selaku anti kejutan suhu dingin (Pillet *et al.*, 2011).

Konsentrasi spermatozoa untuk satu dosis semen cair adalah 5 juta spermatozoa dibandingkan dengan semen beku dengan konsentrasi 25-30 juta spermatozoa per dosis, sehingga penggunaan semen cair lebih banyak ternak betina yang dapat diinseminasi per ejakulasi. Daya fertilitas semen cair sedikit menurun dengan bertambah lamanya waktu penyimpanan (Triwulanningsih *et al.*, 2003). Situmorang *et al.* (1999) menyatakan bahwa

tingkat kebuntingan menurun setelah lama penyimpanan semen cair lebih dari empat hari. Salah satu penyebabnya ialah adanya radikal bebas dalam jumlah yang berlebihan yang dapat merusak membran plasma spermatozoa. Selain penambahan bahan pengencer guna mendukung kehidupan spermatozoa, salah satu metode yang dapat dilakukan dalam mempertahankan kualitas semen cair adalah dengan menambahkan antioksidan pada bahan pengencer. Antioksidan adalah senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya kerusakan membran plasma spermatozoa yang disebabkan oleh radikal bebas dengan cara menangkai aktivitas radikal bebas atau memutus rantai reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Miryanti *et al.*, 2011). Glutathione merupakan salah satu jenis antioksidan yang dapat digunakan. Triwulanningsih *et al.* (2009) menyatakan penambahan glutathione dalam pengencer semen dapat mengurangi kerusakan pada membran plasma spermatozoa semen cair, efek racun yang disebabkan oleh adanya reactive oxygen species (ROS) yang berakibat pada rendahnya fertilitas. Penambahan glutathione sebagai antioksidan ke dalam pengencer air kelapa muda diharapkan dapat mengurangi kerusakan membran plasma spermatozoa akibat radikal bebas, sehingga dapat memperkecil penurunan kualitas spermatozoa baik viabilitas, motilitas dan daya tahan hidup semen cair. Penambahan glutathione ke dalam pengencer semen telah dilaporkan oleh Rizal (2004) pada semen cair domba garut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan beberapa level glutathione dalam pengencer air kelapa kuning telur (AK-KT) terhadap kualitas semen sapi angus selama penyimpanan.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Materi penelitian ini adalah semen segar yang ditampung dari satu ekor sapi angus yang telah mencapai dewasa kelamin dengan umur ternak sapi adalah 3 tahun dan dalam kondisi sehat. Sapi tersebut dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan hijauan diberikan 10% dari berat badan dan konsentrat 0,5 kg/ekor/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan acak lengkap

(RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : P0: AK-KT 100%, P1: AK-KT 100% + G 0,1%, P2: AK-KT 100% + G 0,2%, dan P3 : AK-KT 100% + G 0,3%.

Tahap Persiapan Pengencer

Persiapan Kuning Telur. Kerabang telur dibersihkan dengan menggunakan kapas beralkohol 70%. Setelah itu telur dipecahkan pada bagian lancipnya atau sudut yang runcing. Tuangkan semua putih telur dan pisahkan dari kuningnya. Kuning telur yang masih terbungkus dengan selaput vitelinnya diletakkan di atas

kertas saring, kemudian dimiringkan berputar sehingga semua putih telur dapat terserap habis. Pecahkan selaput vitelinnya, masukkan kuning telur ke dalam gelas ukur. Kuning telur siap digunakan sesuai dengan kebutuhan.

Persiapan Air Kelapa. Air kelapa yang digunakan merupakan air dari buah kelapa muda. Kelapa yang sudah dipetik setelah itu dipotong bagian atas dan dasar lalu diberi lubang kecil pada bagian atas kelapa dengan menggunakan pinset agar dapat diambil air kelapanya sesuai kebutuhan.

Persiapan Glutathione. Glutathione ditumbuk menggunakan penggerus obat hingga halus. Setelah halus, glutathione diletakkan di atas aluminium foil untuk ditimbang menggunakan neraca analitik. Level glutathione ditimbang sesuai perlakuan lalu dimasukkan ke dalam masing masing tabung perlakuan. Level glutathione 0,1% ditimbang dalam jumlah 0,1 g/mL. Level glutathione 0,2% ditimbang dalam jumlah 0,2 g/mL. Level glutathione 0,3% ditimbang dalam jumlah 0,3 g/mL.

Pencampuran Bahan Pengencer Air Kelapa dan Kuning Telur. Air kelapa yang telah diperoleh disimpan di dalam gelas piala yang sebelumnya telah dilakukan pengukuran pH menggunakan kertas lakmus, selanjutnya air kelapa muda dan dengan kuning telur dicampur lalu dihomogenkan menggunakan alat stirrer dan spin bar. Pengencer air kelapa dan kuning telur siap digunakan.

Pencampuran Bahan Pengencer Air Kelapa Kuning Telur dan Glutathione. Masing-masing tabung yang telah diisi dengan pengencer air kelapa muda kuning telur lalu ditambahkan antioksidan glutathione masing masing untuk P1: 0,1%, P2: 0,2%, P3:0,3% dan P0 tanpa glutathione, selanjutnya diaduk hingga homogen. Pengencer siap untuk digunakan.

Penambahan Antibiotik Pennicilin dan Streptomycin. Teteskan antibiotik penicillin 0,5 mL dan streptomycin 0,4 mg/mL ke setiap tabung yang berisi pengencer kemudian tabung digoyangkan agar tercampur hingga homogen lalu pengencer siap digunakan.

Tahap Penampungan Semen

Semen ditampung satu kali seminggu dengan menggunakan metode vagina buatan. Sebelum melakukan penampungan, vagina buatan terlebih dahulu siapkan air panas bersuhu 50 -55oC, kemudian masukkan pada klep yang ada di vagina buatan. Setelah air penuh tutup klep. Setelah itu masukkan udara melalui klep

yang disediakan. Beri pelicin (vaselin) pada bagian muka vagina buatan. Kemudian periksa suhu bagian dalam dari vagina buatan dengan menggunakan thermometer. Bila berada pada suhu 42oC – 44oC penampungan dapat dilakukan. Pasang tabung penampung pada sisi yang lain dari vagina buatan dan lindungi tabung penampung agar tidak terkena sinar matahari secara langsung. Jika vagina buatan telah siap, penampungan semen dapat dilakukan.

Siapkan sapi betina (pemancing) pada kandang jepit yang telah disediakan, kemudian dekatkan sapi jantan. Tarik tali kekang pejantan supaya berada di belakang betina. Biarkan sapi jantan mencumbui sapi betina. Pada saat sapi jantan menaiki sapi betina pertama kali, cegah penis untuk masuk ke dalam alat kelamin betina dengan jalan memegang preputiumnya. Pada saat itu juga petugas yang memegang tali kekang menarik pejantan ke arah belakang agar turun dari tubuh betina. Usaha menurunkan pejantan dari tubuh betina disebut false mount. Setelah melakukan false mount, pejantan akan lebih bernafsu untuk kembali menaiki betina. Pada saat sapi jantan menaiki sapi betina lagi, pegang preputiumnya dan arahkan penisnya ke dalam vagina buatan. Bila terasa ada gerakan ejakulasi, maka lepaskan vagina buatan bersamaan dengan turunnya sapi jantan dari sapi betina. Jika semen terlihat pada tabung penampung, lakukan gerakan angka delapan agar semua semen hasil ejakulasi dapat turun dan tertampung dalam tabung penampung semen. Kemudian semen yang diperoleh dapat langsung dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan kualitas semen.

Tahap Evaluasi Semen Segar

Semen yang diperoleh dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan secara makroskopis meliputi : warna, volume, bau, konsistensi, pH. Pemeriksaan secara mikroskopis meliputi: gerakan massa spermatozoa, konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas.

Tahap Pengenceran dan Penyimpanan Semen

Semen diencerkan dengan pengencer air kelapa kuning telur yang disuplementasi dengan glutathione sesuai perlakuan. Semen yang telah diencerkan, disimpan pada suhu 3-5oC dan dilakukan evaluasi setiap 24 jam terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa.

Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diteliti adalah: motilitas spermatozoa merupakan persentase spermatozoa yang bergerak progresif pada suatu lapang pandang. Motilitas spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10x40. Penilaiannya adalah dengan memberikan angka berkisar antara 0 - 100% dengan skala 5% (Arifiantini, 2012). Dilakukan penilaian pada 5 lapang pandang yang berbeda. Viabilitas spermatozoa diketahui dengan mengamati preparat hasil pewarnaan differensial (eosin-negrosin) menggunakan mikroskop. Spermatozoa hidup mempunyai kepala berwarna putih sebaliknya yang mati berwarna merah (Arifiantini, 2012). Perhitungan viabilitas dilakukan pada 10 lapang pandang yang berbeda. Perhitungan abnormalitas dilakukan

dengan cara menempatkan preparat hasil pewarnaan differensial di bawah mikroskop dan diamati menggunakan pembesaran lensa 10x40, sebanyak 200 sel spermatozoa. Abnormalitas dapat terjadi pada bagian kepala maupun ekor spermatozoa (Arifiantini, 2012). Daya tahan hidup spermatozoa yang diamati adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama persentase motilitas spermatozoa masih berada di atas persentase motilitas yang layak untuk inseminasi buatan yaitu lebih dari 40% gerakan progresif.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan software IBM SPSS Statistics 25 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas atau daya gerak spermatozoa merupakan salah satu parameter utama yang digunakan pada penilaian kualitas semen. Persentase motilitas adalah gambaran dari

aktifitas spermatozoa yang progresif dan berkorelasi sangat erat dengan fertilitas (Pamungkas dan Anwar, 2013). Rerata nilai motilitas spermatozoa sapi angus dari setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh perlakuan terhadap motilitas spermatozoa

Hari ke	Perlakuan (%)				P-Value
	P0	P1	P2	P3	
0	79,50 ± 2,09 ^a	79,50 ± 2,09 ^a	79,50 ± 2,09 ^a	79,50 ± 2,09 ^a	1,000
1	69,00 ± 4,18 ^b	68,50 ± 3,79 ^b	73,00 ± 2,09 ^b	51,50 ± 6,75 ^a	0,000
2	57,50 ± 3,53 ^b	60,00 ± 3,53 ^{bc}	65,50 ± 1,11 ^c	36,00 ± 6,75 ^a	0,000
3	43,00 ± 4,47 ^b	48,00 ± 4,47 ^b	56,00 ± 2,23 ^c	26,50 ± 7,82 ^a	0,000
4	32,50 ± 2,50 ^b	36,50 ± 3,79 ^b	47,00 ± 2,09 ^c	16,00 ± 4,18 ^a	0,000
5	21,00 ± 2,23 ^b	28,00 ± 4,10 ^c	37,00 ± 1,11 ^d	8,00 ± 3,25 ^a	0,000

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

Hasil analisis statistik menunjukkan persentase motilitas spermatozoa setelah pengenceran (hari ke-0) pada setiap perlakuan berbeda tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa sapi angus, namun pada hari pertama sampai hari ke lima penyimpanan menunjukkan persentase motilitas spermatozoa berbeda nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan. Perlakuan P2 mampu mempertahankan rataan motilitas spermatozoa lebih tinggi yaitu pada hari pertama 73,00±2,09 %, hari ke dua 65,50±1,11%, hari ke tiga 56,00 ±2,23%, hari ke empat 47,00 ±2,09% dan hari

ke lima 37,00 ±1,11% dibandingkan dengan perlakuan P0 (kontrol) yang tidak ditambahkan glutathione. Tingginya persentase motilitas spermatozoa dibandingkan kontrol (P0) diduga terjadi karena adanya glutathione sebagai antioksidan yang dapat mencegah terjadinya reaksi peroksida lipid oleh radikal bebas. Hal ini didukung oleh Holt (2000) yang menyatakan bahwa glutathione berfungsi mencegah terjadinya peroksidasi lipida membran sel spermatozoa selama proses pengolahan semen, sehingga dapat mempertahankan motilitas dan integritas membran plasma sel. Hasil ini tidak

berbeda jauh dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Triwulanningsih *et al.* (2003) yang melaporkan persentase motilitas spermatozoa pada sapi FH dalam pengencer tris sitrat yang ditambahkan glutathione sebanyak 0,5 mM mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sebesar $48,75 \pm 11,47\%$ pada penyimpanan hari ke empat.

Persentase motilitas spermatozoa dapat dipertahankan mencapai 40% masing-masing perlakuan dicapai pada hari berbeda dimana P0 dan P1 motilitas spermatozoa sebesar $43,00 \pm 4,47\%$ dan $48,00 \pm 4,47\%$ dicapai pada hari ke tiga. Sebaliknya P2 dan P3 dicapai pada hari ke empat dan pertama dengan motilitas sebesar $47,00 \pm 2,09\%$ dan $51,50 \pm 6,75\%$ (Tabel 1). Keadaan ini diduga karena adanya glutathione pada perlakuan P2 (glutathione 0,2%) sebagai antioksidan dapat mempertahankan motilitas serta mencegah kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas. Glutathione merupakan antioksidan primer yang berfungsi mencegah terjadinya pembentukan radikal bebas serta mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi senyawa yang kurang memiliki dampak negatif (Kusumaningrum *et al.*, 2007). Perlakuan P3 menunjukkan persentase motilitas lebih rendah secara nyata ($P < 0,05$) dari P0, P1, dan P2. Persentase motilitas pada P3 terlihat hanya bertahan pada hari pertama dengan persentase motilitas spermatozoa $51,50 \pm 6,75\%$. Memasuki hari kedua persentase motilitas P3 berada di bawah 40% dengan nilai $36,00 \pm 6,75\%$. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan level glutathione 0,3% ke dalam pengencer AK-KT berdampak negatif atau toksik bagi spermatozoa karena level yang terlalu banyak sehingga menurunkan persentase motilitas spermatozoa. Hal ini didukung oleh pernyataan Uysal dan Bucak (2007) bahwa penambahan konsentrasi glutathione yang berlebih dapat menimbulkan efek negatif atau efek toksik yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa.

Reaksi yang ditimbulkan oleh radikal bebas pada membran plasma sel terutama pada asam lemak tak jenuh akan membentuk radikal bebas baru, yang jika bertemu dengan molekul lain akan terjadi lagi reaksi dan membentuk radikal baru juga sehingga terjadi reaksi berantai dan reaksi itu akan berhenti ketika membran plasma sel telah rusak atau dihentikan dengan menambahkan antioksidan. Upaya untuk meminimalkan kerusakan spermatozoa oleh radikal bebas adalah dengan penambahan

antioksidan ke dalam pengencer (Amtiran *et al.*, 2020). Pemberian glutathione dapat menstabilkan struktur membran dengan cara meminimalkan pembentukan hasil peroksida dalam reaksi peroksidasi lipid sehingga kerusakan membran dapat dicegah dan nilai motilitas dapat dipertahankan (Fitrianti, 2013). Glutathione mampu menetralkan kerja radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif. Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa penting untuk mempertahankan integritas sel, yakni asam lemak, khususnya asam lemak tak jenuh; DNA yang merupakan perangkat genetik sel; dan protein yang memegang berbagai peran sebagai enzim, antibodi, pembentuk maktriks, sitoskeleton (Suryohudoyo, 2000).

Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas merupakan daya hidup spermatozoa sebagai indikator kualitas spermatozoa (Sukmawati *et al.*, 2014). Viabilitas dihitung dengan melihat jumlah spermatozoa yang hidup dan mati menggunakan media eosin-negrosin. Spermatozoa hidup ditandai dengan spermatozoa tidak menyerap warna merah (bening atau putih), sedangkan spermatozoa mati akan terlihat penyerapan warna merah ungu dari eosin-negrosin. Rerata nilai viabilitas spermatozoa sapi angus dari setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2. Pada data tersebut terlihat adanya penurunan persentase viabilitas spermatozoa, tetapi penurunan masing masing perlakuan tidak sama.

Hasil analisis statistik menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa sapi angus setelah pengenceran (hari ke-0) pada setiap perlakuan berbeda tidak nyata ($P > 0,05$), namun pada hari pertama sampai hari ke lima penyimpanan menunjukkan persentase viabilitas spermatozoa berbeda nyata ($P < 0,05$) antar perlakuan. Berdasarkan Tabel 2 terlihat bahwa persentase viabilitas spermatozoa dalam pengencer AK-KT dengan penambahan 0,2% glutathione pada perlakuan P2 lebih baik dibandingkan dengan penambahan 0,1% dan 0,3% glutathione perlakuan P1 dan P3 serta pada perlakuan P0 tanpa penambahan glutathione. Persentase viabilitas spermatozoa pada perlakuan P2 mampu bertahan sampai hari ke lima dengan nilai $50,73 \pm 5,54\%$ lebih tinggi dibandingkan dengan P0: $34,12 \pm 1,95\%$, P1: $38,20 \pm 3,05\%$, dan P3 : $26,76 \pm 9,27\%$. Hal ini disebabkan karena peranan glutathione yang mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat

radikal bebas hasil metabolisme sel spermatozoa sehingga dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa lebih lama.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa kadar antioksidan dalam pengencer dapat mempengaruhi viabilitas spermatozoa, sehingga dengan penambahan antioksidan glutathione

dalam pengencer AK-KT dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan oksidatif sehingga berpengaruh pada kelangsungan hidup spermatozoa. Nilai viabilitas berkorelasi dengan kemampuan fertilisasi spermatozoa, jika nilai viabilitas tinggi maka kemampuan fertilitas akan tinggi (Blegur *et al.*,2020).

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap viabilitas spermatozoa

Hari ke	Perlakuan (%)				P-Value
	P0	P1	P2	P3	
0	85,16 ± 1,80 ^a	85,33 ± 1,53 ^a	86,65 ± 1,32 ^a	85,61 ± 1,31 ^a	0,427
1	76,68 ± 3,45 ^b	78,10 ± 2,14 ^b	82,21 ± 2,40 ^b	66,27 ± 8,69 ^a	0,001
2	67,29 ± 5,25 ^b	70,51 ± 2,50 ^{bc}	75,77 ± 2,69 ^c	51,55 ± 9,08 ^a	0,000
3	55,93 ± 8,05 ^b	57,01 ± 5,57 ^{bc}	66,75 ± 3,40 ^c	41,97 ± 10,64 ^a	0,001
4	45,69 ± 6,13 ^b	46,32 ± 3,40 ^b	57,64 ± 3,08 ^c	34,30 ± 10,64 ^a	0,000
5	34,12 ± 1,95 ^{ab}	38,20 ± 3,05 ^b	50,73 ± 5,54 ^c	26,76 ± 9,27 ^a	0,000

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

Menurut Hidayaturrahmah (2007) yang mengatakan bahwa viabilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kebutuhan akan nutrisi. Nutrisi akan digunakan oleh spermatozoa untuk dijadikan energi sehingga jika kebutuhan nutrisi spermatozoa berkurang maka viabilitas spermatozoa akan menurun. Dalam penelitian ini digunakan pengencer AK-KT yang dapat menyediakan sumber energi (karbohidrat), mengandung bahan-bahan yang dapat melindungi spermatozoa selama proses penyimpanan dan bersifat buffer untuk mencegah perubahan pH yang membunuh spermatozoa akibat terbentuknya asam laktat. Air kelapa muda mengandung glukosa dan fruktosa yang juga terdapat dalam semen (Sulmartiwi *et al.*, 2011). Menurut Toelihere (1993), penyimpanan spermatozoa memerlukan fruktosa yang dimanfaatkan sebagai sumber energi bagi spermatozoa dan air kelapa muda merupakan bahan pengencer yang mempunyai kandungan fruktosa. Kuning telur mengandung banyak protein, vitamin yang larut dalam air dan minyak sehingga ideal digunakan sebagai pengencer (Fahrullah, 2012). Kuning telur juga mengandung glukosa yang lebih suka digunakan oleh sel-sel spermatozoa sapi untuk metabolismenya dari pada fruktosa yang terdapat di dalam semen (Toelihere,1993). Kuning telur berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari kejutan suhu dingin karena mengandung lipoprotein dan lesitin.

Berdasarkan data pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa ketersediaan antioksidan

glutathione yang cukup dalam pengencer AK-KT dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa. Hal ini dukung oleh Syarifuddin *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa penambahan glutathion dalam pengencer semen, baik dalam bentuk semen cair dingin maupun semen beku dapat mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa karena glutathion dapat mencegah terjadinya kerusakan membran plasma dan kematian spermatozoa akibat terjadinya peroksidasi lemak membran. Ditambahkan Triwulanningsih *et al.* (2009) bahwa adanya penambahan glutathione dalam medium pengencer akan mencegah timbulnya radikal bebas yang muncul selama proses pembuatan dan penyimpanan semen cair, sehingga memperpanjang daya hidup semen cair.

Selama pengamatan terjadi penurunan persentase viabilitas spermatozoa pada setiap perlakuan. Hal ini dapat terjadi oleh berbagai faktor yaitu secara alamiah sel akan mengalami kematian, spermatozoa mengalami stres pada saat pengenceran dan spermatozoa mengalami penurunan kualitas dan jumlah spermatozoa mati lebih banyak setelah penyimpanan selama penyimpanan terjadi (Yani dan Nuryadi, 2001). Kematian sel spermatozoa dapat terjadi jika tidak ada perlindungan antioksidan (Mittal *et al.*, 2010).

Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Salah satu indikator penting diketahui dalam menentukan kualitas spermatozoa adalah

persentase abnormalitas spermatozoa, karena struktur sel yang abnormal akan menyebabkan terjadinya gangguan ketika fertilisasi (Afiati *et*

al., 2015). Rerata persentase abnormalitas spermatozoa sapi angus dari setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap abnormalitas spermatozoa.

Hari ke	Perlakuan (%)				P-Value
	P0	P1	P2	P3	
0	5,44 ± 1,29 ^a	5,64 ± 1,64 ^a	5,26 ± 1,16 ^a	5,28 ± 1,16 ^a	0,965
1	5,73 ± 1,70 ^a	5,94 ± 1,50 ^a	5,41 ± 1,09 ^a	5,55 ± 1,07 ^a	0,934
2	5,77 ± 1,51 ^a	6,12 ± 1,73 ^a	5,69 ± 1,17 ^a	5,66 ± 1,26 ^a	0,953
3	6,22 ± 1,97 ^a	6,49 ± 1,59 ^a	6,13 ± 1,36 ^a	6,33 ± 1,03 ^a	0,985
4	6,58 ± 1,90 ^a	6,55 ± 1,65 ^a	6,20 ± 1,29 ^a	6,46 ± 1,07 ^a	0,977
5	6,80 ± 1,82 ^a	6,79 ± 1,65 ^a	6,52 ± 1,37 ^a	6,69 ± 1,22 ^a	0,990

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

Hasil analisis statistik pada semua perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) pada waktu pengamatan hari ke 0 sampai dengan hari ke 5. Rataan persentase abnormalitas spermatozoa sapi angus dalam pengencer AK-KT dengan penambahan glutathione mengalami kenaikan seiring dengan lama waktu penyimpanan. Terjadinya kenaikan persentase abnormalitas spermatozoa diduga selain karena waktu proses pembentukan spermatozoa yang tidak sempurna dalam tubuli seminiferi juga disebabkan karena kerusakan yang disebabkan akibat cara pengkoleksian dan proses pengenceran semen serta pembuatan ulasan untuk pengamatan. Ihsan (2012) menyatakan bahwa pengencer dan pembuatan preparat ulas yang kasar dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Meningkatnya angka abnormalitas dapat juga disebabkan karena adanya peroksidasi lipid (Suyadi *et al.*, 2015). Semakin lama waktu penyimpanan maka semakin tinggi persentase abnormalitas yang disebabkan oleh stress dingin dan ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama penyimpanan pada suhu 5OC (Yani dan Nuryadi, 2001).

Data Tabel 3 dapat dilihat kenaikan persentase abnormalitas spermatozoa yang terjadi tidak terlalu drastis dan tergolong rendah, dimana pada pengamatan hari ke 0 hingga pada hari ke lima setelah penyimpanan pada suhu dingin menunjukkan persentase abnormalitas spermatozoa dalam kisaran normal kurang dari 20% yaitu berkisar antara 5,41 ± 1,29 – 6,80 ± 1,82%. BSN (2017) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa kurang dari 20% masih dapat digunakan untuk inseminasi.

Rendahnya persentase kenaikan abnormalitas spermatozoa sapi angus dalam penelitian ini diduga karena terdapat kandungan zat nutrisi dalam pengencer AK-KT yang mampu mencegah peningkatan abnormalitas akibat suhu dingin. Hal ini didukung oleh pendapat Effendi *et al.* (2015) yang mengatakan bahwa kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein yang berfungsi mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa dan mencegah terjadinya kejutan suhu dingin (cold shock).

Hasil penelitian ini terlihat bahwa persentase kenaikan abnormalitas pada perlakuan P1, P2, dan P3 lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan P0 (kontrol). Hal ini diduga karena adanya kandungan antioksidan glutathione pada perlakuan P1, P2, dan P3 yang dapat mengurangi dan mengatasi kerusakan spermatozoa akibat radikal bebas sehingga dapat menekan kenaikan angka abnormalitas yang terjadi. Siswanto *et al.* (2015) menyatakan bahwa penambahan antioksidan pada pengencer semen dapat menekan produksi reactive oxygen spesies berlebih sehingga dapat mempertahankan kualitas spermatozoa.

Jenis abnormalitas yang dijumpai selama penelitian adalah abnormalitas sekunder, berupa kepala dan ekor terpisah dan ekor melingkar. Menurut Firdausi *et al.* (2014) kerusakan pada spermatozoa bisa diakibatkan ketika pembuatan ulasan pada object glass, sehingga abnormalitas yang terbentuk yaitu spermatozoa dengan ekor yang patah atau kepala tanpa ekor. Susilawati *et al.* (2016) menambahkan abnormalitas sekunder terjadi ketika proses pendinginan atau pembekuan dan ketika preparasi membuat preparat.

Pengaruh Perlakuan terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Daya tahan hidup spermatozoa yang dimaksud adalah kemampuan spermatozoa untuk tetap bergerak dalam kurun waktu tertentu setelah penyimpanan *in vitro* (Hine *et al.*, 2014).

Daya tahan hidup spermatozoa (hari) diukur dengan lama spermatozoa bisa bertahan dalam penyimpanan dengan persentase motilitas minimal 40% (Blegur *et al.*, 2020). Daya tahan hidup spermatozoa setiap perlakuan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan terhadap daya tahan hidup spermatozoa

Perlakuan	Daya Tahan Hidup (Hari)
P0	3,00±0,00 ^b
P1	3,20±0,44 ^b
P2	4,00±0,00 ^c
P3	1,40±0,54 ^a
P-Value	0,000

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

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap daya tahan hidup spermatozoa. Perlakuan P2 menunjukkan daya tahan hidup spermatozoa lebih lama yaitu lama penyimpanan 4 hari, diikuti perlakuan P1 : 3,20 hari, P0 : 3,00 hari, dan P3 : 1,40 hari. Hal ini kemungkinan karena ketiadaan dan perbedaan level unsur pelindung di dalam pengencer sehingga daya tahan hidup spermatozoa setiap perlakuan yang disimpan pada suhu rendah berbeda selama penyimpanan.

Hasil penelitian ini menunjukkan perlakuan P2 dapat mempertahankan daya hidup lebih lama hingga 4 hari dibandingkan P0 dan P1 yaitu 3 hari dan 3,20 hari. Hal ini diduga karena P0 tidak memiliki unsur pelindung seperti antioksidan sehingga tidak dapat mencegah terjadinya kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Daya tahan hidup spermatozoa pada perlakuan P1 lebih rendah dibandingkan P2 disebabkan oleh penambahan level 0,1% glutathione dalam pengencer yang belum optimal sehingga perlindungan terhadap spermatozoa tidak optimal. Menurut Syariffudin *et al.* (2012) penambahan glutathione yang kurang sesuai mengakibatkan peningkatan reactive oxygen species (ROS) selama kultur *in vitro* yang dapat menyebabkan rusaknya sel spermatozoa. Pengencer AK-KT yang ditambahkan 0,2% glutathione pada perlakuan P2 mampu mengurangi kerusakan akibat radikal bebas. Hal ini didukung oleh Triwulanningsih *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa adanya penambahan

glutathione dalam medium pengencer akan mencegah radikal bebas yang muncul selama proses pembuatan dan penyimpanan semen cair, sehingga memperpanjang daya hidup semen cair. Antioksidan merupakan senyawa yang bisa memperlambat terjadinya kerusakan diakibatkan oleh radikal bebas dengan jalan memutus rantai reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Miryanti *et al.*, 2011).

Pada perlakuan pengencer AK-KT yang ditambahkan glutathione daya tahan hidup spermatozoa terendah terlihat pada perlakuan P3 dengan lama penyimpanan 1,40 hari. Rendahnya daya tahan hidup spermatozoa pada P3 dapat disebabkan oleh adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang mengakibatkan terjadi penurunan pH dan kondisi ini dapat bersifat racun terhadap spermatozoa yang kemudian berakibat pada rendahnya daya gerak spermatozoa hingga terjadi kematian. Rhoyan *et al.* (2014) menyatakan bahwa rendahnya persentase daya tahan hidup dapat disebabkan oleh adanya aktifitas metabolisme spermatozoa yang membentuk asam laktat dalam media pengencer. Asam laktat yang berlebihan pada pengencer dapat menyebabkan perubahan pH yang dapat menimbulkan efek racun dan kematian yang tinggi bagi spermatozoa (Widjaya, 2011). Rendahnya daya tahan hidup spermatozoa pada P3 juga diduga karena penambahan level glutathione 0,3% dalam pengencer AK-KT justru menyebabkan toksik bagi spermatozoa sapi angus sehingga tidak dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa yang lebih lama.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa penambahan glutathione 0,2% dalam pengencer AK-KT memberikan pengaruh

terbaik dan lebih efektif dalam mempertahankan kualitas semen sapi angus.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk melihat fertilitas spermatozoa dari penggunaan

glutathione 0,2% dalam pengencer AK-KT terhadap angka konsepsi sapi angus.

DAFTAR PUSTAKA

- Aerens CD, Ihsan MN, Isnaini N. 2012. Perbedaan Kuantitatif dan Kualitatif Semen Segar Pada Berbagai Bangsa Sapi Potong. Malang.
- Afiati F, Yulnawati MR, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon, 1(4) : 930-934.
- Amtiran DE, Hine TM, Uly K. 2020. Pengaruh penambahan vitamin e dalam pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas spermatozoa babi duroc. Jurnal Peternakan Lahan Kering, 2(4) : 1111-1118.
- Arifiantini RI. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan. PT Penerbit IPB Press, Bogor.
- Blegur J, Nalley WM, Hine TM. 2020. Pengaruh Penambahan virgin coconut oil dalam pengencer tris kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi bali selama preservasi (influence addition virgin coconut oil in tris egg yolk on the quality of bali bull spermatozoa during preservation). Jurnal Nukleus Peternakan, 7(2) : 130-138.
- BSN (Badan Standarisasi Nasional). 2017. SNI 4869-1:2017. Semen Beku-Bagian 1: Sapi. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.
- Ducha N, Susilawati T, Aulanni'am, Wahjuningsih S. 2013. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi limousin selama penyimpanan pada refrigerator dalam pengencer cep-2 dengan suplementasi kuning telur. Jurnal Kedokteran Hewan, 7(1) : 5-8.
- Effendi FI, Wahjuningsih S, Ihsan MN. 2015. Pengaruh pengencer tris aminomethane kuning telur yang disuplementasi sari kulit manggis (*garcinia mangostana*) terhadap kualitas semen sapi limousin selama penyimpanan suhu dingin 50C. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan 25(3) : 69-79.
- Fahrullah. 2012. Pengaruh penggunaan probiotik komersial sebagai bahan curing pada pembuatan telur itik asin. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta : Bandung.
- Firdausi PA, Susilawati T, Wahyuningsih S. 2014. Kualitas semen sapi limousin selama pendinginan menggunakan pengencer cep-2 dengan penambahan berbagai konsentrasi santan. Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production, 15(1) : 21-30.
- Fitrianti I. 2013. Pengaruh glutathione dalam pengencer dasar tris aminomethane kuning telur-glycerol terhadap kualitas semen kambing boer setelah pembekuan cepat. Skripsi. Universitas Brawijaya.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. Reproduction in Farm Animals, 96-109.
- Hidayaturrahmah. 2007. Waktu motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan mas (*cyprinus carpio* l) pada beberapa konsentrasi larutan fruktosa. Journal of Bioscientiae, 4(1), 9-18.
- Hine TM, Burhanuddin, Marawali A. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. Jurnal Veteriner 15 (2) : 263-273.
- Holt WV. 2000. Basic Aspects Of Frozen Storage Of Semen. Animal Reproduction Science, 62(1-3) : 3-22.
- Ihsan MN. 2012. Penggunaan telur itik sebagai pengencer semen kambing. Ternak

- Tropika Journal of Tropical Animal Production, 12(1) : 10-14.
- Kartusudjana R. 2001. Ciri-ciri atau tanda keabnormalitasan pada semen kambing peranakan etawa (PE). Jakarta: Departemen Pendidikan Nasional, 15(7) : 78-83.
- Kusumawati ED, Krisnaningsih ATN, Romadlon RR. 2016. Kualitas spermatozoa semen beku sapi simental dengan suhu dan lama thawing yang berbeda. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan, 26(3) : 38-41.
- Kusumaningrum DA, Situmorang P, Triwulanningsih E, Sianturi RG. 2007. Penambahan plasma semen sapi dan anti oksidan glutathione untuk meningkatkan kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner, 188-194.
- Mere CYL. 2016. Air kelapa dan air buah lontar sebagai modifikasi pengencer alternatif pada semen babi landrace. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana.
- Miryanti YIP, Sapei L, Budiono K, dan Indra S. 2011. Ekstraksi antioksidan dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). J. Repository. Universitas Katolik Parahyangan Bandung.
- Mittal P, Gupta V, Kaur G, Garg AK, Singh A. 2010. Phytochemistry and pharmacological activities of *Psidium guajava*. IJPSR, 1(9), 9-19.
- Pamungkas FA, Anwar. 2013. Daya Tahan hidup spermatozoa kambing boer dalam pengencer tris kuning telur yang disimpan pada temperatur berbeda. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2013. Bogor (Indonesia). Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Hlm. 331-338
- Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M. 2011. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, 75(1) : 105-114.
- Rhoyan YH, Lestari TD, Setiawan R. 2014. Kualitas semen cair dingin domba garut pada tiga jenis larutan pengencer. *Jurnal Ilmu Ternak*, 14(1) : 63-67
- Rizal M. 2004. Pengaruh Penambahan glutathion ke dalam pengenceran tris terhadap kualitas semen cair domba garut. *Buletin Peternakan*, 27(2) : 63-72.
- Siswanto, Suyadi, Susilorini TE. 2015. Pengaruh penambahan ekstrak bawang merah (*allium cepa*) dalam pengencer terhadap kualitas semen kambing peranakan etawah (pe) selama penyimpanan suhu ruang. J. Repository. Fakultas Peternakan Univ.Brawijaya. Hal :1-9
- Situmorang P, Triwulanningsih E, Lubis A, Caroline W, Sugiarti T. 1999. Teknologi penyimpanan semen pada suhu 5 0C. Edisi Khusus. Kumpulan Hasil-Hasil Penelitian Peternakan APBN TA, 2000.
- Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. 2014. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis pejantan unggul. *JITV* 19(3):168-175.
- Sulabda IN, Puja IK. 2010. Pengaruh substitusi air kelapa muda dengan pengencer sitrat kuning telur terhadap motilitas dan persentase hidup spermatozoa anjing. *Buletin Veteriner Udayana* (2)2: 109-17.
- Sulmartiwi L, Ainurrohmah E, Mubarak AS. 2011. Pengaruh konsentrasi air kelapa muda dan madu dalam nacl fisiologis terhadap motilitas dan lama hidup spermatozoa ikan patin. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 3(1) : 67-72.
- Suryohudoyo P. 2000. Oksidan, antioksidan dan radikal bebas. Di Dalam: *Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler*. Jakarta: CV Sagung Seto. Hlm, 31-47.
- Susilawati T. 2011. Tingkat keberhasilan inseminasi buatan dengan kualitas dan deposisi semen yang berbeda pada sapi peranakan ongole. *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*, 12(2) : 15-24.
- Susilawati T, Wahyudi FE, Anggraeni I, Isnaini N, Ihsan MN. 2016. Penggantian bovine serum albumin pada pengencer Cep-2 dengan serum darah sapi dan putih telur terhadap kualitas semen cair sapi limousin selama pendinginan. *Jurnal Kedokteran Hewan-Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 10(2) : 98-102.
- Suyadi TE, Susilorini AL. 2015. Kualitas semen kambing peranakan etawah dalam pengencer tris terhadap kualitas semen kambing peranakan etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3(4): 22-24.
- Syarifuddin A, Dewi Indira Laksmi D, Bebas I. 2012. Efektivitas penambahan berbagai konsentrasi glutathion terhadap daya

- hidup dan motilitas spermatozoa sapi bali post thawing. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(2) : 173-185.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung. Hal, 52, 57.
- Triwulanningsih E, Situmorang P, Sugiarti T, Sianturi RG, Kusumaningrum DA. 2009. Efektifitas Penambahan glutathione pada pengencer laktosa dan air kelapa terhadap viabilitas semen cair/dingin (chilled) kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). *Balai Penelitian Ternak*. Bogor.
- Triwulanningsih E, Situmorang P, Sugiarti T, Sianturi RG, Kusumaningrum DA. 2003. Pengaruh penambahan glutathione pada medium pengencer sperma terhadap kualitas semen cair (chilled semen). *JITV*, 8(2) : 91-97.
- Uysal O, dan Bucak MN. 2007. Effects of oxidized glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen-thawed ram semen. *Acta Veterinaria Brno*, 76(3) : 383-390.
- Widjaya N. 2011. Pengaruh pemberian susu skim dengan pengencer tris kuning telur terhadap daya tahan hidup spermatozoa sapi pada suhu penyimpanan 50C. *Jurnal Penelitian Ilmu Peternakan*, 9(2) : 72–76.
- Yani A, Nuryadi TP. 2001. Pengaruh tingkat substitusi santan kelapa pada pengencer santan kelapa terhadap kualitas semen kambing peranakan etawa. *J Biosains*, 1(1) : 12-5.