

## PENGARUH PENAMBAHAN LAKTOSA DI DALAM PENGECER TRIS DAN SITRAT TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR SAPI ANGUS

*(The effect of additional lactose in tris and citrate diluents on the quality of liquid semen of angus cattle)*

Satria J. S. Rihi Leo<sup>1</sup>, Wilmientje M. Nalley<sup>2</sup>, Kirenus Uly<sup>2\*</sup>, Hendriana L.L. Belli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana

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

\*Correspondent author, email: [ulykirenus@gmail.com](mailto:ulykirenus@gmail.com)

### ABSTRAK

Laktosa merupakan satu-satunya karbohidrat yang terdapat pada susu dan berfungsi sebagai sumber energi tambahan dan pelindung membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh cold shock selama penyimpanan pada suhu rendah. Tujuan dari melakukan penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh penambahan laktosa di dalam pengencer tris dan sitrat terhadap kualitas semen cair. Satu ekor sapi angus dengan umur 3 tahun dalam kondisi sehat. Semen diencerkan dengan pengencer P0: Tris-kuning telur (T-KT) 100%, P1: Sitrat-kuning telur (S-KT) 100%, P2: T-KT 50%+S-KT 50%, P3: T-KT 50%+S-KT 50%+Laktosa 1,5g, P4: T-KT 50%+S-KT 50%+Laktosa 3,0g, P5: T-KT 50%+S-KT 50%+Laktosa 4,5g. Semen setelah diencerkan disimpan pada suhu 3-5oC. Semen dievaluasi pasca pengenceran dan setiap 24 jam penyimpanan terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa. Data dianalisis menggunakan analysis of variance (ANOVA) dan uji Duncan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada perlakuan P3(P>0,05) terbaik dibandingkan dengan perlakuan lainnya, yaitu dengan persentase nilai motilitas spermatozoa sebesar 43,50±2,23%, viabilitas spermatozoa 53,07±3,36%, abnormalitas spermatozoa 8,01±2,14%, dan daya tahan hidup spermatozoa selama 6,60,00±0,54 hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan pengencer kombinasi T-KT dan S-KT dengan penambahan laktosa 1,5 g merupakan pengencer terbaik dalam mempertahankan kualitas semen cair sapi angus.

**Kata-kata kunci:** laktosa, semen sapi angus, sitrat, tris, kuning telur

### ABSTRACT

Lactose is the only carbohydrate found in milk and serves as an additional source of energy and protects the plasma membrane of spermatozoa from damage due to cold shock during storage at low temperatures. The purpose of this study was to examine the effect of adding lactose in tris and citrate diluents on the quality of liquid semen. One 3 year old angus cow in healthy condition. Semen was diluted with diluent P0: Tris-egg yolk (T-EY) 100%, P1: Citrate-egg yolk (C-EY) 100%, P2: T-EY 50 %+C-EY 50%, P3: T-EY 50%+ C-EY 50%+Lactose 1.5g, P4: T-EY 50%+ C-EY 50%+Lactose 3.0g, P5: T- EY 50%+ C-EY 50%+Lactose 4.5g. After diluted cement is stored at a temperature of 3-5oC. Semen was evaluated post dilution and every 24 hours of storage for motility, viability, abnormalities and survival of spermatozoa. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and Duncan's test. The results of this study showed that the P3 (P>0.05) treatment was the best compared to other treatments, namely the percentage of spermatozoa motility values of 43.50±2.23%, spermatozoa viability was 53.07±3.36%, spermatozoa abnormalities were 8.01±2.14%, and spermatozoa survival was 6.60.00±0.54 days. The results of this study indicate that using a combination of T-EY and C-EY diluents with the addition of 1.5g lactose is the best diluent in maintaining the quality of liquid semen of angus cattle.

**Keywords:** lactose, Angus cattle semen, citrate, tris, egg yolk

## PENDAHULUAN

Teknologi inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu teknologi dalam reproduksi ternak yang sudah dikenal meluas dimasyarakat, memiliki manfaat dalam mempercepat peningkatan mutu genetik ternak (Suprianto dan Djuliansah, 2018). Keberhasilan program IB dapat berhasil jika semua faktor pendukung dapat dipenuhi secara optimal salah satu diantaranya adalah kualitas semen yang digunakan, baik semen cair ataupun semen beku. Penggunaan semen cair lebih baik pada daerah yang sulit mendapatkan nitrogen cair. Semen cair membutuhkan peralatan sederhana dan semen disimpan pada suhu 3-5oC, spermatozoa akan mengalami cold shock saat penyimpanan sehingga akan menurunkan daya gerak, daya hidup dari spermatozoa atau menurunkan kualitas semen (Susilawati, 2013).

Penurunan kualitas semen, selain akibat cold shock juga dapat disebabkan adanya penumpukan radikal bebas sisa hasil metabolisme. Kualitas semen harus dipertahankan, oleh karena itu di dalam pengencer harus ada zat yang dapat melindungi membran spermatozoa dari cold shock. Bahan pengencer semen harus mengandung sumber energi, buffer, dan pelindung membran seperti lipoprotein dan lecithin yang ada pada kuning telur ayam (Nugroho *et al.*, 2014).

Upaya memperbaiki kualitas semen cair dapat dilakukan dengan cara menambahkan beberapa jenis gula di dalam pengencer, seperti yang telah dilaporkan oleh beberapa peneliti yakni Khaeruddin dan Kurniawan (2020) pada

pembekuan semen ayam, Humairoh (2014) pada pembekuan semen domba garut dan preservasi semen kambing boer oleh (Rizal *et al.*, 2021). Laktosa merupakan satu-satunya karbohidrat yang terdapat pada susu dan merupakan sumber energi. Laktosa berfungsi sebagai sumber energi tambahan dan pelindung membran plasma spermatozoa dari kerusakan akibat pengaruh cold shock selama penyimpanan pada suhu rendah. Telah dilaporkan bahwa penambahan laktosa dalam pengencer semen sudah banyak dilakukan pada semen beku domba garut (Singh *et al.* 1995), pada preservasi semen domba priangan dalam pengencer tris dengan tambahan laktosa (Souhoka *et al.*, 2009), menggunakan laktosa dalam pengencer Tris pada spermatozoa sapi bali (Labetubun dan Siwa 2011), penambahan laktosa pada semen beku domba garut (Rizal 2009) dan pada semen cair domba garut (Rizal *et al.*, 2003)

Peningkatan produktivitas ternak sapi bali sebagai penghasil daging dapat melalui persilangan antara sapi bali dan sapi angus menggunakan semen cair maupun semen beku, merupakan salah satu peluang pengembangannya. Sapi angus merupakan jenis sapi potong, yang memiliki pertumbuhan sangat cepat, dagingnya tebal dengan pakan sederhana, tahan penyakit bila berada di daerah tropis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan laktosa terhadap kualitas spermatozoa sapi angus di dalam pengencer Tris, Sitrat dan kombinasi antara kedua pengencer tersebut.

## METODE PENELITIAN

### Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan semen segar dari satu ekor sapi angus yang berumur tiga tahun, dalam kondisi tubuh sehat dan sudah terlatih untuk penampungan semen. Sapi angus ini dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat makan dan minum, setiap hari ternak diberi pakan hijauan sebanyak 10% dari berat badan, konsentrat 0,5Kg/ hari dan diberi minum secara ad libitum.

### Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL), yang terdiri dari enam perlakuan dan lima ulangan sehingga terbentuk tiga puluh unit percobaan.

Keenam perlakuan tersebut adalah: P0: Tris-kuning telur (T-KT) 100%, P1: Sitrat-kuning telur (S-KT) 100%, P2: T-KT 50%+S-KT 50%, P3: T-KT 50%+S-KT 50%+Laktosa (L) 1,5w/v, P4: T-KT 50%+S-KT 50%+L 3,0 w/v, P5: T-KT 50%+S-KT 50%+L 4,5 w/v.

### Penyiapan Kuning Telur

Telur ayam dibersihkan menggunakan kapas yang dibasahi alkohol 70%. Kemudian dipecahkan lalu pisahkan kuning telur dari putih telur. Letakan kuning telur pada kertas saring sambil diputar agar semua putih telur terserap habis, membran vitellin kuning telur ditoreh dan kuning telur dimasukkan dalam gelas ukur.

### Penyiapan Pengencer Tris-Kuning Telur

Tris (hydroxymetil) aminomethane (Merk, Jerman) ditimbang sebanyak 3,634g, asam sitrat-monohidrat (Merk, Jerman) 1,99g, fruktosa 0,50g, lalu dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer, selanjutnya tambahkan aquadest sampai dengan 100mL lalu homogenkan. Pembuatan pengencer Tris-kuning telur, ambil 80mL pengencer Tris dan tambahkan 20mL kuning telur, dihomogenkan menggunakan stirrer dan spin bar, selanjutnya ditambahkan penisilin-G 0,5mL (PT. Meiji Indonesia Pharmaceutical Industries, Bangil) dan streptomisin sulfat 0,4mg/mL (PT. Meiji Indonesia Pharmaceutical Industries, Bangil) ke dalam setiap tabung perlakuan yang sudah terisi pengencer.

### Penyiapan Pengencer Sitrat-Kuning Telur

Timbang natrium sitrat (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>) (Merk, Jerman) sebanyak 2,9g kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan tambahkan

aquades sampai dengan 100mL, kemudian dilarutkan hingga homogen. Pembuatan pengencer Sitrat, ambil 80mL larutan Sitrat dan tambahkan 20mL kuning telur, dihomogenkan menggunakan stirrer dan spin bar, kemudian tambahkan antibiotik sama seperti pembuatan pengencer Tris kuning telur.

### Penyiapan Laktosa

Laktosa yang digunakan dalam bentuk bubuk ditimbang menggunakan timbangan analitik sesuai dengan dosis yang dibutuhkan dalam penelitian pada P3,P4 dan P5 secara berturut-turut sebanyak 1,5g, 3,0g dan 4,5g.selanjutnya laktosa dimasukan kedalam tabung pengencer yang sudah terisi pengencer kombinasi T-KT 50% dan S-KT 50% kemudian dihomogenkan. Komposisi pengencer penelitian sesuai perlakuan dengan menggunakan Tris, Sitrat, kombinasi Tris dan Sitrat dan penambahan laktosa Tabel 1.

Tabel. 1. Komposisi pengencer perlakuan dengan berbagai konsentrasi laktosa.

Bahan Pengencer	Perlakuan					
	P0	P1	P2	P3	P4	P5
Tris-KT (mL)	100	0	50	50	50	50
Sitrat-KT (mL)	0	100	50	50	50	50
Laktosa (w/v)	0	0	0	1,5	3,0	4,5
Jumlah (mL)	100	100	100	100	100	100

Keterangan : (w/v) = weight/volume; mL= mililiter

### Penampungan dan Evaluasi Semen

Semen ditampung menggunakan metode vagina buatan, dilakukan pada pagi hari berkisar jam 06:30 sampai 07:00, semen segar yang diperoleh dievaluasi secara:

Makroskopis: Volume semen dapat dilihat secara langsung pada tabung penampung berskala yang dinyatakan dalam mL/ejakulasi. Warna semen dapat dilihat pada tabung penampung. Konsistensi/kekentalan dari semen dapat dilihat dengan cara memiringkan tabung penampung yang berisi semen secara perlahan-lahan sambil mengamati gerakan perpindahan semen ke posisi semula. Konsistensi dapat teramati dari gerakan yang cepat atau lambat perpindahan semen ke posisi semula. Derajat keasaman (pH) dari semen dapat diketahui menggunakan kertas indikator pH, dengan cara celupkan dengan cepat kertas indikator ke dalam tabung berisi semen kemudian langsung diangkat, perhatikan perubahan warna dan

cocokkan pada standar warna yang ada pada kertas indikator pH.

Mikroskopis: Gerakan massa spermatozoa. Evaluasi gerakan massa untuk melihat pergerakan spermatozoa secara berkelompok, penilaian dibagi kedalam 3 kelompok : a). Gelombang besar, gelap, tebal seperti awan, dan cepat berpindah tempat(+++), b). Gelombang kecil tipis, dan bergerak lambat(++), c). Gelombang massa tipis, tidak adanya gumpalan awan dan lambat berpindah tempat(+). Motilitas spermatozoa ditentukan dari hasil pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif dan lensa okuler 40×10. Motilitas spermatozoa dinilai berdasarkan pergerakan progresif spermatozoa yang ditentukan secara subjektif pada 10 lapang pandang yang berbeda, nilai yang diberikan berkisaran antara 0 sampai 100% dengan skala 5%.

Konsentrasi spermatozoa menunjukkan jumlah sel spermatozoa/mL semen. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan Haemocytometer Neubauer, semen diencerkan dengan larutan eosin 2%, homogenkan dengan gerakan memutar selanjutnya teteskan beberapa tetes di tissue kemudian teteskan pada haemocytometer hingga memenuhi chamber, amati dibawah dengan perbesaran  $40\times 10$ .

Viabilitas spermatozoa dilakukan dengan cara mewarnai satu tetes semen dengan empat tetes eosin-negrosin kemudian dibuat preparat ulas tipis dan dikeringkan pada heating table. Spermatozoa hidup ditandai dengan spermatozoa tidak menyerap warna eosin-negrosin sedangkan spermatozoa mati akan terlihat penyerapan warna merah ungu. Pengamatan viabilitas dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran  $40 \times 10$ , spermatozoa dihitung dengan total  $\geq 200$  spermatozoa atau pada 10 lapang pandang yang berbeda.

Penilaian terhadap abnormalitas spermatozoa menggunakan cara yang sama pada penyiapan preparat viabilitas. Abnormalitas spermatozoa ditandai dengan morfologi spermatozoa tidak normal baik abnormalitas primer maupun sekunder.

### **Pengenceran dan Penyimpanan Semen**

Semen yang memiliki motilitas  $>70\%$ , konsentrasi  $>900\times 10^6$  sel/mL dan abnormalitas  $<15\%$  digunakan dalam penelitian ini. Semen

dibagi ke dalam 6 tabung perlakuan yang telah terisi pengencer dengan berbagai jenis konsentrasi: P0: T-KT 100%, P1: S-KT 100%, P2: T-KT 50% + S-KT 50%, P3: T-KT 50% + S-KT 50% + L 1,5g, P4: T-KT 50% + S-KT 50% + L 3,0g, P5: T-KT 50% + S-KT 50% + L 4,5g, setiap perlakuan diulang sebanyak lima kali. Selanjutnya tabung reaksi dimasukkan ke dalam wadah berisi air bersih dan disimpan pada suhu 3-5 oC. Evaluasi kualitas semen meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan daya tahan hidup (DTH) spermatozoa setiap 24 jam hingga spermatozoa motil mencapai minimum 40% (SNI 2017).

### **Variabel Penelitian**

Variabel yang diukur dalam penelitian adalah: 1). Motilitas spermatozoa(%), 2). Viabilitas spermatozoa(%), 3). Abnormalitas spermatozoa(%), 4). Daya tahan hidup spermatozoa (hari) diukur dengan lama spermatozoa dapat bertahan hidup dalam penyimpanan, dengan persentase motilitas minimal 40%.

### **Analisis Data**

Data dianalisis menggunakan analysis of variance (ANOVA) dari rancangan acak lengkap yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan dan dianalisis menggunakan software IBM SPSS statistics 25 for windows dan MS office Excel 2007.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Karakteristik semen segar sapi angus**

Karakteristik semen segar yang diperoleh dari 5 kali penampungan memiliki rerata volume  $3,20\pm 0,45$  mL dengan konsistensi sedang dan motilitas  $77,50\pm 2,50\%$  ditampilkan pada Tabel 2.

Volume semen yang diperoleh  $3,20\pm 0,45$  mL dengan kisaran 2-6 mL, hasil ini berbeda dengan laporan Oktaviani (2020) dimana volume semen sapi angus mencapai 5,0-7,9 mL, 6,7-7,2 mL berdasarkan laporan dari Rahmawati (2016) dan 6,6-7,0 mL (Rahmadiansyah dan Susilawati 2021). Namun hasil penelitian ini masih berada pada kisaran normal volume semen sapi yaitu 1-15 mL (Garner dan Hafez, 2000).

Susilawati (2013) bahwa kualitas semen baik dari seekor pejantan unggul dapat dipengaruhi dari beberapa faktor, diantaranya: umur pejantan, sifat genetika, ukuran testis, ukuran badan, frekuensi ejakulasi, musim, suhu, dan makanan.

Warna semen segar yang dihasilkan selama penelitian ini adalah krem, hasil ini sesuai dengan pendapatnya Isnaini dan Fazrien (2020) bahwa semen sapi normal berwarna seperti putih susu atau krem, keputih-putihan dan keruh. Sapi diperkirakan 10% menghasilkan semen yang normal dengan warna kekuning-kuningan oleh karena adanya zat riboflavin yang dibawa oleh suatu kromosom somatis resesif dan tidak berpengaruh terhadap fertilisasi (Susilawati, 2013). Semen sapi yang rendah

dengan konsentrasi spermatozoa yang tinggi dapat menyebabkan warna semen menjadi krem atau putih susu. Hasil penelitian ini sesuai

dengan pendapat dari Nabilla *et al.* (2018) dimana warna dari semen sapi berwarna putih susu dan krem.

Tabel 2. Karakteristik semen segar sapi angus selama penelitian

Karakteristik semen	Rerata±SD
Volume (mL)	3,20±0,45
Warna	Krem
Konsistensi	Sedang
pH	6,46±0,13
Gerakan Massa (+)	2-3
Konsentrasi spermatozoa ( $\times 10^6$ sel/mL)	1020,00±87,75
Motilitas spermatozoa (%)	77,50±2,50
Viabilitas spermatozoa (%)	86,04±2,33
Abnormalitas spermatozoa (%)	5,67±0,80

Derajat keasaman (pH) semen sapi angus hasil penelitian yaitu 6,46±0,13, hasil ini tidak beda jauh dengan laporan Nyuwita *et al.* (2015) bahwa pH semen segar berkisar antara 6,43-6,50. Derajat keasaman berperan penting karena dapat mempengaruhi viabilitas spermatozoa. Konsistensi semen sapi angus yang diperoleh selama penelitian termasuk dalam kategori sedang, karena sesuai dengan laporan dari Suyadi dan Rachmawati (2012) yang menyatakan bahwa warna, konsistensi dan konsentrasi spermatozoa mempunyai sangkut paut satu sama lain. Semen yang tidak kental maka konsentrasi spermatozoa menjadi rendah dan warnanya akan semakin pucat, sementara semen dengan konsistensi sedang sampai kental akan memiliki konsentrasi spermatozoa yang tinggi dengan warna semen putih susu atau krem (Ismaya 2014)

Gerakan massa semen segar sapi angus dari hasil penelitian memperoleh nilai ++ sampai +++. Hasil ini sama dengan hasil penelitian Kurnia *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa gerakan massa pada sapi lokal lainnya seperti sapi bali diperoleh rerata sebesar 2,7 setara dengan (++/+++ ) yang disebabkan karena kondisi ternak maupun lingkungan. Hal ini menunjukkan bahwa semen segar sapi angus memiliki gerakan yang aktif, dan (Garner dan Hafez, 2000) mengemukakan bahwa perbedaan pada nilai gerakan massa dapat disebabkan oleh perbedaan bangsa dan umur ternak.

Motilitas adalah daya gerak spermatozoa yang dijadikan sebagai faktor pendukung dalam penilaian kualitas spermatozoa untuk IB. Hasil penelitian ini menunjukkan nilai motilitas spermatozoa

77,50±2,50% dengan kisaran 75-80%. Hasil ini lebih tinggi dari laporan Anwar *et al.*, (2014) dengan nilai motilitas spermatozoa sebesar 62,50±5,00%. Garner dan Hafez (2000) melaporkan motilitas spermatozoa sapi berkisar antara 40-75%, merupakan syarat semen yang dapat di proses selanjutnya dibuat semen cair maupun semen beku minimal 70%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa nilai konsentrasi spermatozoa sapi angus memiliki rata-rata 1020,00±87,75×10<sup>6</sup> sel/mL. Hasil yang diperoleh selama penelitian ini nilainya lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Agossou dan Koluman (2018) pada sapi limousin sebesar 1004 ± 218,71 ×10<sup>6</sup> sel/mL dan produksi semen beku sapi Limousin, Simmental dan Angus secara berturut-turut : 1143,58 ± 124,16 ×10<sup>6</sup> sel/mL; 1283,13 ± 119,43 ×10<sup>6</sup> sel/mL dan 1068,83 ± 116,24 ×10<sup>6</sup> sel/mL.

Viabilitas spermatozoa semen sapi angus yang diperoleh adalah 86,04±2,33%. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan laporan dari Rizal (2009) yang menyatakan viabilitas spermatozoa dari sapi bali sebesar 86,75%, sapi madura adalah 85% dan sapi peranakan ongole sebesar 97% (Ratnawati *et al.*, 2017). Garner dan Hafez (2000) melaporkan bahwa viabilitas spermatozoa yang dapat digunakan untuk pembuatan semen cair maupun semen beku kisaran 60-75% spermatozoa hidup.

Nilai abnormalitas spermatozoa dari penelitian sebesar 5,67±0,80%. Semen yang dihasilkan masih dalam kisaran normal sesuai dengan Hafez (2000) yaitu abnormalitas spermatozoa tidak boleh lebih dari 20%.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas merupakan salah satu parameter yang sangat penting dan dapat dijadikan sebagai dasar fertilitas spermatozoa. Rerata nilai

motilitas spermatozoa sapi angus hasil penelitian ini dapat dilihat pada Tabel.3

Tabel 3. Rerata motilitas spermatozoa sapi angus selama penyimpanan (%)

Hari Ke	Perlakuan						Nilai P
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	
0	78,00±4,27 <sup>a</sup>	78,00±4,27 <sup>a</sup>	77,50±3,53 <sup>a</sup>	77,00±2,73 <sup>a</sup>	77,50±3,53 <sup>a</sup>	77,00±2,73 <sup>a</sup>	0,995
1	71,00±2,23 <sup>a</sup>	71,00±3,79 <sup>a</sup>	71,50±4,87 <sup>a</sup>	72,00±2,73 <sup>a</sup>	72,00±2,73 <sup>a</sup>	69,00±3,79 <sup>a</sup>	0,763
2	65,00±3,35 <sup>a</sup>	63,50±6,51 <sup>a</sup>	66,00±5,47 <sup>a</sup>	66,00±2,23 <sup>a</sup>	66,00±2,23 <sup>a</sup>	61,00±2,23 <sup>a</sup>	0,333
3	57,50±5,00 <sup>a</sup>	56,50±8,58 <sup>a</sup>	59,50±5,12 <sup>a</sup>	59,50±2,73 <sup>a</sup>	58,50±4,87 <sup>a</sup>	55,00±3,06 <sup>a</sup>	0,718
4	51,00±4,18 <sup>b</sup>	49,00±8,58 <sup>ab</sup>	54,00±4,18 <sup>b</sup>	54,50±3,70 <sup>b</sup>	54,00±2,23 <sup>b</sup>	43,50±4,54 <sup>a</sup>	0,013
5	42,50±5,59 <sup>ab</sup>	42,40±6,85 <sup>ab</sup>	49,00±4,18 <sup>b</sup>	49,50±2,73 <sup>b</sup>	45,00±4,67 <sup>b</sup>	36,00±6,51 <sup>a</sup>	0,005
6	34,00±4,18 <sup>ab</sup>	35,40±6,53 <sup>ab</sup>	42,50±2,50 <sup>cd</sup>	43,50±2,23 <sup>cd</sup>	36,10±4,72 <sup>bc</sup>	28,50±7,82 <sup>a</sup>	0,001
7	24,00±5,47 <sup>ab</sup>	27,50±7,28 <sup>b</sup>	35,70±3,42 <sup>c</sup>	37,50±3,53 <sup>c</sup>	28,00±4,47 <sup>b</sup>	18,50±8,58 <sup>a</sup>	0,000

<sup>abcd</sup>Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Hasil analisis statistik terhadap motilitas spermatozoa sapi angus pasca pengenceran hingga hari ke-3 penyimpanan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05) antar perlakuan. Namun pada hari ke-4 hingga hari ke-7 penyimpanan terjadi perbedaan yang nyata (P<0,05) antar perlakuan. Pada hari ke-5 penyimpanan motilitas spermatozoanya pada P5 sudah dibawah 40%, sementara P0, P1 dan P4 teramati pada hari ke-6, sedangkan P2 dan P3 pada hari ke-7.

Perbedaan ini dapat terjadi mungkin karena adanya perlakuan pengencer yang di uji hal ini terlihat bahwa nilai motilitas pada hari ke-5, perlakuan P0: 42,50±5,59% dan P1:42,40±6,85% memiliki nilai yang hampir sama, hal ini disebabkan karena ke-2 perlakuan ini sama-sama sebagai pengencer yang mengandung buffer dan berfungsi dalam mempertahankan pH semen selama penyimpanan. Susilawati (2013) T-KT dan S-KT dapat bersifat penyangga selama preservasi untuk menjaga daya hidup dan fertilitas spermatozoa.

Perlakuan P2 hingga P5 menggunakan pengencer kombinasi dengan penambahan laktosa hingga 4,5g, nilai motilitas P2: 42,50±2,50% dan P3: 43,50±2,23% mempunyai nilai yang hampir sama pada hari ke-6, P4: 45,00±4,67% nilai motilitas diatas 40% teramati pada hari ke-5 dan P5 pada hari ke-4 dengan nilai: 43,50±4,54%. Pada P2 dan P3 menunjukkan hasil yang sama, hal ini mungkin didukung dengan adanya kombinasi pengencer T-KT dan S-KT dan juga pada P3 terdapat penambahan laktosa sebanyak 1,5g yang dapat memberi sumber energi tambahan lebih baik guna mendukung daya gerak spermatozoa.

Sedangkan pada P4 dan P5 menunjukkan hasil yang berbeda yaitu P4: 45,00±4,6% dan P5:43,50±4,54%, perbedaan ini disebabkan meningkatnya level laktosa yang ditambahkan pada P4 dan P5 memberikan dampak yang negatif atau sudah bersifat toksin bagi spermatozoa. (Rizal, 2009).

Pengaruh toksin yang muncul mungkin dikarenakan adanya ketidakstabilan tekanan osmotik didalam pengencer seiring dengan bertambahnya dosis laktosa, sehingga mengakibatkan terjadinya peningkatan tekanan osmotik didalam sel yang menimbulkan kerusakan pada membran plasma sel. Selama penyimpanan tekanan osmotik harus tetap dipertahankan karena jika tidak dipertahankan dapat mengakibatkan tekanan osmotik didalam dan diluar sel menjadi berbeda sehingga mengalir ke daerah yang bertekanan osmotik tinggi. Toksin ini dapat membuat kerusakan pada organel sel, ketidaklancaran metabolisme dan kematian sel spermatozoa. Efek toksin ini dapat dicurigai menyebabkan respirasi didalam mitokondria sel menjadi tidak lancar. Apabila hal ini terjadi organel sel tersebut akan mengalami kerusakan dan menyebabkan pergerakan sel spermatozoa terganggu karena terganggunya metabolisme energi (Siswanto, 2006).

Disisi lain laktosa berguna sebagai sumber nutrisi dan juga dapat memiliki fungsi yang hampir sama dengan senyawa antioksidan dan mampu mengurangi senyawa-senyawa pengoksidasi, serta dapat berperan meminimalkan terjadinya reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi yang ditimbulkan dapat bersifat kurang baik karena produk yang dihasilkan dapat merusak mutu membran plasma sel dan

laktosa juga memiliki fungsi ganda dalam mempertahankan kehidupan spermatozoa. Hal ini ditunjukkan pada P3 dengan penambahan laktosa sebanyak 1,5g memberi nilai yang terbaik, hasil ini sesuai dengan laporan dari Rizal (2009) yaitu dosis optimum penggunaan laktosa sebanyak 1g karena jika penambahan laktosa lebih dari 2g dapat mengakibatkan kualitas spermatozoa menjadi lebih rendah dibandingkan dengan 1g, tingginya konsentrasi laktosa yang ditambahkan dapat menimbulkan ketidakstabilan tekanan osmotik dalam larutan pengencer yang menyebabkan daya adaptasi spermatozoa menjadi rendah sehingga akan mengganggu proses biokemik didalam sel yang pada akhirnya akan menurunkan daya hidup spermatozoa itu sendiri selama masa penyimpanan (Rizal, 2009).

Laktosa adalah jenis karbohidrat dari kelompok disakarida, laktosa sendiri tersusun atas satu unit glukosa dan satu unit galaktosa yang keduanya dapat digunakan oleh spermatozoa untuk proses glikolisis dan siklus krebs agar menghasilkan energi berupa adenosin trifosfat (ATP). Laktosa juga dapat digunakan oleh spermatozoa sebagai krioprotektan

ekstraseluler seperti karbohidrat yang berfungsi untuk melindungi membran plasma dari larutan dingin selama penyimpanan disuhu 3-5oC (Rizal *et al.*, 2003)

Vishwanath dan Shannon (2000) laktosa dapat menjadi krioprotektan karena berasal dari golongan karbohidrat dan mempunyai kemampuan untuk menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar hydrated. Laktosa termasuk dalam golongan karbohidrat disakarida mampu yang dapat menggantikan posisi air pada permukaan membran plasma sel yang langsung berhubungan dengan pengencer, selanjutnya dinyatakan bahwa laktosa dapat berinteraksi langsung dengan gugus pusat fosfolipid polar selama pembekuan, dan menurunkan interaksi ikatan van der Waals di antara rantai karbon.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa adalah salah satu indikator yang dapat digunakan untuk menilai kualitas semen, semakin tinggi persentase viabilitas semen maka semakin baik kualitas semen tersebut (Adrianto, 2017).

Tabel 4. Rerata viabilitas spermatozoa sapi angus selama penyimpanan (%)

Hari Ke	Perlakuan						Nilai P
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	
0	85,92±3,32 <sup>a</sup>	85,54±4,05 <sup>a</sup>	85,24±5,30 <sup>a</sup>	83,29±3,10 <sup>a</sup>	85,65±2,24 <sup>a</sup>	84,90±2,24 <sup>a</sup>	0,872
1	78,66±1,75 <sup>a</sup>	81,04±5,14 <sup>a</sup>	79,06±5,09 <sup>a</sup>	79,46±1,71 <sup>a</sup>	78,47±2,05 <sup>a</sup>	77,89±2,95 <sup>a</sup>	0,772
2	72,70±4,19 <sup>a</sup>	72,64±5,88 <sup>a</sup>	73,61±4,84 <sup>a</sup>	74,47±2,41 <sup>a</sup>	71,18±3,29 <sup>a</sup>	72,52±3,84 <sup>a</sup>	0,880
3	68,31±4,51 <sup>a</sup>	67,37±9,32 <sup>a</sup>	70,50±2,77 <sup>a</sup>	69,11±2,13 <sup>a</sup>	65,45±5,41 <sup>a</sup>	63,77±6,35 <sup>a</sup>	0,460
4	61,37±5,93 <sup>ab</sup>	60,89±10,82 <sup>ab</sup>	65,21±3,26 <sup>b</sup>	62,78±3,93 <sup>ab</sup>	61,70±5,19 <sup>ab</sup>	54,64±9,14 <sup>a</sup>	0,303
5	53,76±4,60 <sup>ab</sup>	52,96±7,22 <sup>ab</sup>	58,67±4,38 <sup>b</sup>	58,32±4,36 <sup>b</sup>	53,93±4,27 <sup>ab</sup>	48,97±10,79 <sup>a</sup>	0,198
6	44,54±3,97 <sup>ab</sup>	45,38±8,73 <sup>ab</sup>	58,40±12,08 <sup>c</sup>	53,07±4,35 <sup>bc</sup>	46,75±4,70 <sup>ab</sup>	37,25±10,84 <sup>a</sup>	0,008
7	32,83±3,57 <sup>a</sup>	37,14±7,67 <sup>a</sup>	47,64±4,52 <sup>b</sup>	45,28±4,68 <sup>b</sup>	34,96±4,43 <sup>a</sup>	28,80±9,16 <sup>a</sup>	0,000

<sup>abc</sup> Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

Hasil analisis statistik terhadap viabilitas spermatozoa sapi angus pasca pengenceran hingga hari ke-3 penyimpanan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata (P>0,05) antar perlakuan. Namun pada hari ke-4 hingga hari ke-7 penyimpanan terjadi perbedaan yang nyata (P<0,05) antar perlakuan.

Viabilitas spermatozoa sapi angus dalam perlakuan P2 dan P3 lebih tinggi (P<0,05) dari keempat perlakuan lainnya, hal ini dapat dibuktikan bahwa kombinasi antara T-KT dan S-KT dan dengan penambahan laktosa dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa.

Nilai viabilitas berkaitan erat dengan kemampuan fertilisasi spermatozoa, apabila nilai viabilitas tinggi maka kemampuan fertilitas juga akan tinggi. Viabilitas spermatozoa sapi angus dapat menurun selama preservasi hal ini disebabkan karena cengkaman dingin, lain dari itu yang mempengaruhi turunnya viabilitas adalah penumpukan radikal bebas sisa hasil metabolisme (Butta *et al.*, 2021). Persentase viabilitas spermatozoa sapi angus hasil penelitian ini pada hari ke-7 berkisar antara 45,28±4,68%-47,64±4,52%, hasil ini hampir sama dengan laporan Blegur *et al.* (2020) pada sapi bali dengan perlakuan T-KT-VCO yang

dapat mempertahankan viabilitas sebesar  $48.68 \pm 2.25\%$ , hingga 6 hari preservasi.

Viabilitas spermatozoa selama penyimpanan mengalami penurunan, hal ini terjadi karena adanya penurunan suhu penyimpanan yang dapat menyebabkan perubahan struktur dari fosfolipid membran plasma spermatozoa dan mengganggu fungsi dan permeabilitas membran sel. Rataan persentase viabilitas spermatozoa mengalami penurunan seiring dengan lamanya penyimpanan dengan tingkat penurunan viabilitas spermatozoa berbeda-beda nilainya antar perlakuan. Nilai penurunan viabilitas tertinggi pada P0: 11,7% hari ke-6, P1: 8,4% hari ke-1, P2: 10,76% hari ke-6, P3: 10,79% hari ke-4, P4: 11,79% hari ke-6 dan P5: 11,72% hari ke-5.

Menurut Sukmawati *et al.* (2014) spermatozoa yang mengalami kerusakan membran akan mengganggu proses metabolisme

sehingga sintesis ATP menjadi terhambat dan terjadinya penurunan viabilitas spermatozoa, dilaporkan dari Susilawati (2013) bahwa spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat, terutama pada bagian post nuclear caps sehingga sel spermatozoa yang mati akan menyerap warna eosin-negrosin, dan sel spermatozoa yang masih hidup mempunyai kondisi membran yang baik sehingga zat warna tidak dapat menembus membran, yang menyebabkan sel spermatozoa tetap berwarna putih/bening (tidak menyerap warna eosin-negrosin).

### Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Hasil analisis abnormalitas menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ) pada semua perlakuan Tabel 5.

Tabel 5. Rerata abnormalitas spermatozoa sapi angus selama penyimpanan

Hari Ke	Perlakuan						Nilai P
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	
0	$6,06 \pm 2,71^a$	$6,35 \pm 2,51^a$	$5,94 \pm 2,83^a$	$6,04 \pm 2,52^a$	$6,38 \pm 2,30^a$	$6,74 \pm 2,15^a$	0,996
1	$6,49 \pm 2,71^a$	$6,84 \pm 2,78^a$	$6,12 \pm 2,92^a$	$6,14 \pm 2,47^a$	$6,55 \pm 2,26^a$	$6,93 \pm 2,15^a$	0,993
2	$6,17 \pm 2,65^a$	$6,88 \pm 2,57^a$	$6,46 \pm 2,38^a$	$6,93 \pm 2,24^a$	$6,99 \pm 2,27^a$	$7,12 \pm 2,07^a$	0,987
3	$7,06 \pm 2,69^a$	$7,05 \pm 2,59^a$	$6,89 \pm 2,51^a$	$6,54 \pm 2,42^a$	$7,15 \pm 2,29^a$	$7,32 \pm 2,03^a$	0,997
4	$6,89 \pm 2,24^a$	$7,38 \pm 2,43^a$	$7,81 \pm 2,96^a$	$6,90 \pm 2,15^a$	$7,22 \pm 2,27^a$	$7,46 \pm 2,06^a$	0,988
5	$7,42 \pm 2,22^a$	$7,36 \pm 2,36^a$	$6,73 \pm 2,53^a$	$7,15 \pm 2,25^a$	$7,72 \pm 2,31^a$	$7,76 \pm 2,14^a$	0,982
6	$7,29 \pm 2,30^a$	$7,58 \pm 2,36^a$	$7,35 \pm 2,47^a$	$8,01 \pm 2,14^a$	$8,00 \pm 2,39^a$	$7,89 \pm 2,18^a$	0,992
7	$7,74 \pm 2,37^a$	$7,71 \pm 2,15^a$	$7,61 \pm 2,50^a$	$8,17 \pm 2,17^a$	$8,24 \pm 2,53^a$	$8,07 \pm 2,20^a$	0,997

<sup>a</sup>Superskrip dengan huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Tidak adanya perbedaan antar perlakuan menunjukkan bahwa pengencer Tris dan Sitrat, maupun kombinasi Tris dan Sitrat dengan penambahan laktosa tidak memengaruhi abnormalitas spermatozoa. Hasil ini menunjukkan bahwa pengencer memiliki kondisi fisiologis yang sama dengan spermatozoa sehingga dapat mendukung daya simpan spermatozoa secara *in vitro*.

Nilai abnormalitas hasil penelitian ini antara 5,94-8,07 sedikit lebih tinggi dibanding hasil laporan Djita *et al.* (2021); Blegur *et al.* (2020) dan Meo *et al.* (2022) yaitu dengan nilai abnormalitas mencapai 4,13%; 5,92%; 7,06%. Abnormalitas spermatozoa yang diamati selama penelitian adalah spermatozoa yang tidak memiliki ekor, ekor melingkar, kepala tanpa ekor, hal ini sesuai Susilawati (2013) yang menyatakan bahwa abnormalitas tersebut diatas termasuk abnormalitas sekunder.

Perbedaan nilai abnormalitas yang didapat mungkin disebabkan saat pembuatan preparat ulasan terlalu ditekan atau heating table yang suhunya terlalu panas (Safitri *et al.*, 2018). Garner dan Hafez. (2000) juga melaporkan bahwa kemungkinan terjadinya perbedaan ini disebabkan oleh umur dan faktor kesuburan pejantan. Abnormalitas juga dapat terjadi karena spermatozoa mengalami cold shock dan ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama masa penyimpanan.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Hasil analisis daya tahan hidup (DTH) menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada semua perlakuan Tabel 6.



Tabel 6. Pengaruh perlakuan terhadap daya tahan hidup spermatozoa

Perlakuan	Daya Tahan Hidup (hari)
P0	5,00±0,77 <sup>ab</sup>
P1	5,00±1,00 <sup>ab</sup>
P2	6,00±0,00 <sup>bc</sup>
P3	6,60±0,54 <sup>c</sup>
P4	5,00±0,70 <sup>ab</sup>
P5	4,40±1,14 <sup>a</sup>
Nilai P	0,002

<sup>abc</sup> Superskrip dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Hasil penelitian ini DTH yang diamati adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama persentase motilitas spermatozoa >40% sesuai dengan syarat kelayakan IB, berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap semua variabel yang diuji.

Pada perlakuan P2 dan P3 memiliki daya tahan hidup yang sama dapat disimpan hingga hari ke-6 daripada perlakuan lain, karena pada P2 dan P3 pengencer yang digunakan merupakan kombinasi T-KT dan S-KT yang diduga kedua pengencer memberikan pengaruh positif selama penyimpanan sedangkan pada P3 kombinasi pengencer T-KT dan S-KT juga mendapat suplementasi laktosa 1,5g memberi respon yang sama yaitu motilitas 40% teramati pada hari ke-6.

Hasil penelitian ini makin memperkuat fakta bahwa pengencer berperan penting dalam memperpanjang daya hidup spermatozoa invitro. Jika spermatozoa tidak mendapat suplementasi nutrisi dan bahan pelindung terhadap cold shock, maka spermatozoa akan mengalami

kematian karena kehabisan substrat energi dan energi yang digunakan hanya mengandalkan dari bahan-bahan yang ada dalam pengencer dan plasma semen (Hine *et al.*, 2014).

Kehabisan suplai energi yang terjadi selama masa penyimpanan dapat menyebabkan proses glikolisis untuk menghasilkan energi tidak dapat berlangsung. Cold shock menyebabkan kerusakan membran, jika membran bagian midpiece yang rusak, enzim aspartate amino transferase hilang dan mitokondria tidak bisa merombak ATP menjadi ADP dan seterusnya, sehingga spermatozoa berhenti bergerak (Hine *et al.*, 2014).

Dalam keadaan anaerob, persediaan nutrisi bagi spermatozoa terutama diberikan lewat jalur glikolisis (Migliaccio *et al.*, 2018). Salah satu hasil penelitian menunjukkan bahwa glikolisis dapat menyeimbangi terbatasnya produksi ATP bagi mitokondria dalam menjaga kemampuan daya gerak dari sperma mencit (Chang dan Suarez, 2012).

## SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa kombinasi pengencer T-KT dan S-KT dengan penambahan laktosa 1,5g yaitu dengan persentase nilai motilitas spermatozoa sebesar 43,50±2,23%, viabilitas spermatozoa 53,07±3,36%,

abnormalitas spermatozoa 8,01±2,14%, dan daya tahan hidup spermatozoa selama 6,60,00±0,54 hari merupakan pengencer terbaik dalam mempertahankan kualitas semen cair sapi angus.

## SARAN

Dari hasil penelitian ini, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam pelaksanaan inseminasi buatan dengan menggunakan

kombinasi pengencer T-KT dan S-KT dengan penambahan laktosa 1,5g.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adrianto H. 2017. Buku Ajar Biologi Sel dan Molekuler. Deepublish. CV. Budi Utama
- Agossou D dan Koluman N. 2018. An objective analysis of factors affecting buck semen quality attributes during cryopreservation: a mini review. *annual research dan review in biology*, 27(3), 1–7. <https://doi.org/10.9734/arrb/2018/42087>
- Anwar P, Ondho Y, Samsudewa D. 2014. Pengaruh Pengencer ekstrak air tebu dengan penambahan kuning telur terhadap kualitas spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Peternakan*, 11(2), 48–58.
- Butta CA, Gaina CD, Foeh ND. 2021. Motilitas dan viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer air kelapa-kuning telur ayam kampung. *Jurnal Veteriner Nusantara*, 4(1), 3-3.
- Blegur J, Nalley WM, Hine TM. 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.
- Chang H, Suarez SS. 2012. Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, 86(5), 140–141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.096578>
- Djita FK, Nalley WM, Hine TM, Marawali A. 2021. Pengaruh penambahan ekstrak bawang merah ( *allium cepa* ) dalam pengencer tris - kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi bali pada penyimpanan in vitro. *Jurnal Nukleus Peternakan* 8(2), 92–100.
- Garner DL, Hafez EZE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96–109.
- Hafez EZE. 2000. *Anatomy of male reproduction. Reproduction in farm animals*. 7<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger, Philadelphia
- Hine TM, Marawali A. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. *Jurnal Veteriner*, 15(2), 263-273–273.
- Humairoh L. 2014. Kualitas post-thawed spermatozoa domba yang disentrifugasi sebelum dibekukan dengan pengencer laktosa. *Veterinaria Indonesiana*, 2(1), 31-35.
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan Pada Sapi dan Kerbau*. UGM Press, Yogyakarta.
- Isnaini N, Fazrien WA. 2020. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Kerbau*. Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Khaeruddin, Kurniawan ME. 2020. Keberhasilan pembekuan semen ayam yang diencerkan dan diperkaya dengan glukosa, trehalosa, sukrosa dan laktosa. *Jurnal Veteriner*, 21(3), 476–484. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2020.21.3.476>
- Kurnia A, Soeparna ZIA, Hidayat R. 2018. Fertilitas semen beku dalam tris kuning telur dan skim yang diberi omega-3 pada sapi simmental dengan ransum berlimbuan seng dan selenium minimal. *Jurnal Veteriner*, 19(2), 251–262.
- Labetubun J, Siwa IP. 2011. Kualitas spermatozoa kauda epididimis sapi Bali dengan penambahan laktosa atau maltosa yang dipreservasi pada suhu 3-5°C. *Jurnal Veteriner*, 12(3), 200–207.
- Meo MY, Telnoni SP, Dilak HI. 2022. Kualitas spermatozoa sapi angus ( *bos taurus* ) dalam pengencer tris kuning telur dengan substitusi ekstrak sari buah tomat. *Flobijo*. 1(1), 10–16.
- Migliaccio M, Ricci G, Suglia A, Manfredola F, Mackie K, Fasano S, Pierantoni, R, Chioccarelli T dan Cobellis G. 2018. Analysis of endocannabinoid system in rat testis during the first spermatogenic wave. In *Frontiers in Endocrinology*. 9(5), 268-269 <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00269>
- Nabilla A, Arifiantini RI, Purwantara B. 2018. Kualitas semen segar sapi bali umur produktif dan non-produktif serta penentuan konsentrasi krioprotektan dalam pengencer tris kuning telur. *Jurnal Veteriner*, 19(2), 242–250.
- Nugroho Y, Susilawati T, Wahyuningsih S. 2014. Kualitas semen Sapi Limousin selama pendinginan menggunakan

- pengencer CEP-2 dengan penambahan berbagai konsentrasi kuning telur dan sari buah jambu biji (*Psidium guajava*). *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*, 15(1), 31–42.
- Nyuwita A, Susilawati T, Isnaini N. 2015. Kualitas semen segar dan produksi semen beku sapi simmental pada umur yang berbeda. *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*, 16(1), 61-68.
- Oktaviani, D. 2020. Pengaruh perbedaan umur terhadap kualitas semen segar sapi angus di Balai Inseminasi Buatan Lembang. Dissertation, UIN Sunan Gunung Djati Bandung 2(2), 33.
- Rahmadiansyah AMF, Susilawati IT. 2021. Kualitas semen dan produksi semen beku pada bangsa sapi dan bulan penampungan yang berbeda di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 25(3), 25-36.
- Rahmawati M. 2016. Kualitas semen dan produksi semen beku pada bangsa sapi dan bulan penampungan yang berbeda di balai inseminasi buatan lembang. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 25(3), 25-36.
- Ratnawati D, Isnaini N, Susilawati T. 2017. Pemanfaatan casa dalam observasi motilitas spermatozoa semen cair Sapi Madura dalam pengencer berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 27(1), 80–95.
- Rizal Muhammad, Nisa C, Norliani R. 2021. Daya hidup spermatozoa kambing peranakan boer yang dipreservasi dengan pengencer laktosa dan ekstrak daun kelor. *Prosiding Seminar Nasional Lingkungan Lahan Basah*, 6(3), 45–52.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P. 2003. Kriopreservasi semen domba garut dalam pengencer Tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan*, 19(2), 79–83.
- Rizal M. 2009. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi Bali yang dipreservasi pada suhu 3-5°C dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 14(2), 142–149.
- Safitri AM, Sardjito T, Wibawati PA, Mustofa I, Saputro AL, Prastiya RA. 2018. Kualitas semen segar sapi rambon banyuwangi dalam pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(3), 62–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.20473/jmv.vol1.iss3.2018.62-67>
- Singh MP, Sinha AK, Singh BK. 1995. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology*, 43(6), 1047–1053.
- Siswanto. 2006. Kualitas semen di dalam pengencer tris dan natrium sitrat dengan berbagai karbohidrat dan level gliserol pada proses kriopreservasi semen rusa timor (*Cervus timorensis*). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Souhoka DF, Matatula MJ, Mesang-Nalley WM, Rizal M. 2009. Laktosa mempertahankan daya hidup spermatozoa kambing peranakan etawah yang dipreservasi dengan plasma semen domba priangan. *Jurnal Veteriner*, 10(3), 135–142.
- Standardisasi Nasional Indonesia. 2017. Badan Standardisasi Nasional. 4869.1:2017. Standar Nasional Indonesia (SNI) Semen Beku-Bagian 1:Sapi.
- Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. 2014. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 19(3), 168-175.
- Suprianto S dan Djuliansah D. 2018. Kajian Aplikasi Teknologi Inseminasi Buatan dalam Upaya Peningkatan Produktivitas dan Pendapatan Usaha Ternak Sapi Potong di Kabupaten Tasikmalaya. *Jurnal Pemikiran Masyarakat Ilmiah Berwawasan Agribisnis*, 1(3), 210-211. <https://doi.org/10.25157/ma.v1i3.41>
- Susilawati T. 2013. Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak. Universitas Brawijaya Press, Malang.
- Suyadi A, Rachmawati IN. 2012. Pengaruh  $\alpha$ -tocopherol yang berbeda dalam pengencer dasar tris aminomethane kuning telur terhadap kualitas semen kambing boer yang disimpan pada suhu 5°C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan*, 22(3), 1–8.
- Vishwanath R, Shannon P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 23–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6)