

KUALITAS SEMEN SAPI BALI DENGAN PENAMBAHAN VITAMIN C DAN MINERAL ZN (ZINK) DALAM PENGECER SITRAT KUNING.TELUR

(Quality of bali bulls semen with the addition of vitamin c and mineral zn (zinc) in egg yolk citrate)

Ansgarius F. Armangun, Kirenius Uly, Johny Nada Kihe, Henderiana L.L. Belli, 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: ulykirenius@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi vitamin C dan mineral Zn (Zink) pada pengencer sitrat kuning telur (S-KT) terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali selama penyimpanan. Materi yang digunakan adalah semen segar sapi bali yang berkualitas baik, diencerkan dengan pengencer perlakuan yaitu : P0: S-KT – 100% , P1: S-KT + 0,05 g Zn, P2: S-KT + 0,05 g Vitamin C, P3: S-KT + 0,025 g Vitamin C + 0,025 g Zn, semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 3-5oC. Evaluasi pasca pengenceran dilakukan setiap 24 jam penyimpanan terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi mineral Zn (Zink) pada perlakuan (P1) mempunyai kualitas terbaik ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan lainnya, yaitu dengan motilitas ($43,50 \pm 4,87\%$), viabilitas ($52,20 \pm 6,76\%$), dan abnormalitas ($4,74 \pm 1,14\%$) dan daya tahan hidup ($6,40 \pm 0,89\%$). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suplementasi Zn 0,05 g pada pengencer sitrat- kuning telur memberikan efek yang cukup baik dalam menjaga kualitas spermatozoa sapi bali.

Kata-kata kunci: sitrat - kuning telur, vitamin C, zink, spermatozoa, sapi bali

ABSTRACT

This research aims to find out the effect of vitamin C supplementation and Zn mineral (Zinc) in citrate egg yolk dilution (C-EY) on motility, viability, abnormality and endurance of bali bulls spermatozoa during storage. The material used is fresh sperm of good quality bali bulls. Sement diluted with treatment diluent is: T0: C-EY – 100%, T1: C-EY – 0.05 g Zn, T2: C-EY – 0.05 g Vitamin C, T3: C-EY – 0.025 g Vitamin C – 0.025 g Zn, After diluent semen is stored at a temperature of 3-5oC. Sperm is evaluated post-dilution and every 24 hours of storage against motility, viability and abnormalities. The results showed that Zn (Zinc) mineral supplementation in treatment (T1) has the best quality ($P < 0.05$) compared to other treatments, namely with motility ($43.50 \pm 4.87\%$), viability ($52.20 \pm 6.76\%$), abnormalities ($4.74 \pm 1.14\%$) and durability (6.40 ± 0.89 days). The results of this study showed that Zn 0,05 g in citrate-yolk a fairly good influence in maintaining the quality of spermatozoa of bali bulls.

Keywords: citrate-egg yolk, vitamin C, zinc, spermatozoa, bali bulls

PENDAHULUAN

Keberhasilan inseminasi buatan (IB) ditentukan faktor kualitas semen, jenis pengencer, tahapan preservasi semen, pelaksana IB (inseminator), ketepatan dan kecermatan deteksi estrus (Toelihere, 2006). Selanjutnya dinyatakan bahwa masalah yang sering timbul dalam proses preservasi semen adalah spermatozoa mengalami kejutan dingin (cold shock) sehingga mengakibatkan kerusakan

bahkan terjadi kematian spermatozoa. Menurut Garner dan Hafez (2000) pada suhu ruang spermatozoa mempunyai daya tahan hidup yang sangat pendek yakni berkisar 2-3 jam. Semen yang akan disimpan dalam suhu ruang, harus ditambahkan bahan pengencer yang sesuai untuk menekan laju penurunan kualitas semen yakni motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa. Jenis pengencer yang biasa digunakan dalam

proses preservasi baik semen cair maupun semen beku adalah pengencer dasar sitrat kuning telur. Pemanfaatan sitrat-kuning telur dalam pengenceran semen yakni sitrat berfungsi sebagai buffer dan kuning telur sebagai sumber lesitin dan lipoprotein berperan mencegah kejutan dingin (cold shock) akibat penurunan temperatur yang relatif cepat (Afiati *et al.*, 2013). Natrium sitrat merupakan penyangga yang mampu mempertahankan kestabilan pH pengencer, sedangkan kuning telur bermanfaat sebagai sumber energi dan lipoprotein yang dapat memberikan perlindungan terhadap spermatozoa selama proses preservasi (Pubiandara *et al.*, 2016).

Vitamin C dapat menangkap radikal bebas, mencegah terjadinya reaksi rantai sehingga spermatozoa terhindar dari kerusakan

perosidatif yang dapat mempengaruhi viabilitas serta fertilitas spermatozoa (Aslam *et al.*, 2014).

Pemberian mineral Zn (Zink) merupakan mineral penting pada beberapa respon enzimatis yang terkait dengan metabolisme karbohidrat, sintesis protein serta metabolisme asam nukleat (Abbasi *et al.*, 1980). Selain itu, mineral Zn (Zink) juga mempunyai fungsi sebagai antioksidan serta sebagai imunostimulan sehingga dapat dipakai dalam proses pengenceran semen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas semen sapi bali setelah ditambahkan vitamin C dan mineral Zn (Zink) serta mengetahui kualitas semen sapi bali dalam pengencer sitrat kuning telur yang disuplementasi dengan vitamin C dan mineral Zn.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Penelitian menggunakan semen segar sapi bali yang diperoleh dari seekor sapi bali jantan umur 3 tahun, kondisi sehat, memiliki organ reproduksi normal serta sudah terlatih untuk penampungan semen. Sapi tersebut dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan hijauan diberikan 10% dari berat badan (basis bahan segar) konsentrat 0,5 kg/ hari air minum diberikan add libitum.

Metode Penelitian

Penelitian dirancang menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Perlakuan yang diuji adalah : P0 = Sitrat kuning telur 100%, P1 = Sitrat kuning telur 100% + Zn 0,05 gram, P2 = Sitrat kuning telur 100% + Vitamin C 0,05 gram, P3 = Sitrat kuning telur 100% + Vitamin C 0,025 gram + Zn 0,025 gram.

Persiapan Pengencer Natrium Sitrat

Natrium sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) sebanyak 2,9 gram dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan tambahkan aquades sampai dengan 100 ml. Campuran dilarutkan hingga homogen menggunakan stirrer dan spin bar. Pembuatan pengencer sitrat, ambil 80 mL larutan sitrat dan tambahkan 20 mL kuning telur, di campur menggunakan stirrer, kemudian tambahkan antibiotik.

Penambahan antibiotik penicillin dan streptomycin

Antibiotik penicillin 0,5 ml dan streptomycin 0,4 mg/mL ditambahkan ke dalam setiap tabung yang berisi pengencer kemudian tabung digoyangkan agar tercampur hingga homogen dan pengencer siap digunakan.

Persiapan Kuning Telur

Telur ayam kampung yang baik, dibersihkan dengan kapas yang dibasahi dengan alcohol 70%. Telur dipecahkan dibagian sudut lancipnyatuangkan seluruh putih telur serta pisahkan dari kuning telur. Selanjutnya bersihkan sisa putih telur dengan kuning telur yang masih terbungkus oleh membrane viteline, dengan metode menempatkan pada kertas saring supaya seluruh putih telur terserap habis. Pecahkan selaput vitelinnya, setelah itu kuning telur dimasukkan ke dalam gelas ukur serta siap dimanfaatkan sesuai dengan kebutuhan.

Persiapan vitamin C

Vitamin C dihaluskan menggunakan ulekan obat hingga halus. Setelah halus vitamin C diletakkan diatas aluminium foil untuk ditimbang menggunakan timbangan analitik. Dosis vitamin C ditimbang sesuai perlakuan lalu dimasukkan ke dalam masing-masing tabung perlakuan. Dosis penambahan vitamin C perlakuan 2 (P2) 0,05 g/mL dan pada perlakuan 3 (P3) 0,025 g/mL.

Persiapan mineral Zn (Zink)

Mineral Zn (Zink) dihaluskan menggunakan ulekan obat hingga halus. Setelah halus mineral Zn (Zink) diletakkan dalam aluminium foil untuk ditimbang menggunakan timbangan analitik. Dosis mineral Zn (Zink) ditimbang sesuai perlakuan lalu dimasukkan ke dalam masing-masing tabung perlakuan. Penambahan mineral Zn (Zink) pada perlakuan 1 (P1) 0,05 g/mL dan pada perlakuan 3 (P3) 0,025 g/mL.

Penampungan

Saat sebelum melaksanakan penampungan menggunakan vagina buatan terlebih dulu mempersiapkan air panas bersuhu 50 - 55°C, setelah itu air panas dimasukkan melalui klep vagina buatan hingga $\frac{3}{4}$ bagian kemudian klep ditutup. Setelah itu udara dimasukkan menggunakan metode meniup pada klep. Beri pelicin pada bagian muka vagina buatan. Temperatur pada vagina buatan diatur pada suhu 42-44°C. Pasang tabung penampung pada corong vagina buatan, ikat kuat-kuat dengan karet. Bungkus tabung penampung dengan memakai tisu supaya tidak terkena sinar matahari langsung. Setelah vagina buatan disiapkan, berikutnya penampungan semen bisa dilakukan. Ternak sapi betina ditempatkan dalam kandang jepit, sapi jantan didekatkan dengan sapi betina. Saat sapi jantan menaiki sapi betina arahkan penisnya masuk ke dalam vagina buatan. ejakulasi terjadi bila terjadi gerakan dorongan yang keras dari sapi jantan, lepaskan vagina buatan bertepatan dengan turunnya sapi jantan dari sapi betina. Bila semen kelihatan pada tabung penampung, lakukan gerakan menyerupai angka 8 supaya seluruh semen turun serta tertampung di tabung penampung. Semen yang diperoleh langsung dibawa ke laboratorium untuk dievaluasi.

Evaluasi Semen

Evaluasi semen secara makroskopis adalah warna semen dapat dilihat langsung dari gelas ukur saat penampungan spermatozoa dilakukan. Umumnya spermatozoa berwarna putih susu. Bau sperma dapat diketahui dengan cara mendekatkan semen ke hidung untuk mengetahui aromanya. Volume sperma dapat diukur dengan mengamati angka pada tabung penampung berskala. Konsistensi dinilai dengan memiringkan tabung yang berisi semen dan mengembalikannya pada posisi semula. Konsistensi dapat dinilai berdasarkan kecepatan semen

kembali ke dasar tabung penampung, penilaiannya dikategorikan dalam tiga jenis yaitu: encer, sedang dan kental. Derajat keasaman (pH) dapat diketahui dengan cara meneteskan semen di atas kertas indikator dengan skala 1-14. Perubahan warna pada kertas pH tersebut disesuaikan dengan standar warna pada kertas indikator

Evaluasi secara mikroskopis adalah gerakan masa bergerak cepat (+++), yaitu pergerakan masa spermatozoa yang terlihat menyerupai awan tebal, bergerak agak lambat (++) merupakan pergerakan masa spermatozoa menyerupai awan tipis serta bergerak lambat (+). Konsentrasi spermatozoa menunjukkan jumlah sel spermatozoa tiap satuan volume semen diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 40×10.

Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan haemocytometer. Konsentrasi spermatozoa = $X \times Volume\ spermatozoa \times 10^6$ sperma/ml . X = jumlah spermatozoa hasil perhitungan.

Presentase motilitas spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa ditentukan melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 x 10. Penilaian diberikan mulai nol persen (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai 100% (semua spermatozoa bergerak ke depan).

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 menyerap eosin-negrosin dan terlihat berwarna merah ungu.

Perhitungan nilai viabilitas diperoleh sesuai rumus: .

Abnormalitas dapat diketahui dengan cara semen diwarnai dengan melihat bentuk morfologi spermatozoa yang tidak normal baik abnormalitas primer maupun sekunder.

Variabel Penelitian

Variabel yang diukur pada penelitian ini yaitu:

1. Motilitas spermatozoa (%) adalah presentase spermatozoa yang bergerak progresif pada suatu lapang padang. Penilaian yaitu dengan memberikan angka berkisar antara 0-100% dengan skala 5%.

2. Abnormalitas spermatozoa (%) perhitungan dilakukan dengan cara menempatkan preparat hasil pewarnaan differensial di bawah mikroskop dan diamati dengan pembesaran 10 x 40, sebanyak kurang lebih 200 sel sperma. Abnormalitas dapat terjadi pada bagian kepala ataupun ekor spermatozoa.

3. Viabilitas spermatozoa (%) diketahui dengan mengamati preparat hasil pewarnaan differensial (eosin-negrosin) menggunakan mikroskop. Spermatozoa hidup memiliki kepala berwarna putih sedangkan yang mati berwarna merah.

4. Daya tahan hidup ditandai dengan adanya motilitas dan daya gerak yang dijadikan patokan atau cara yang mudah dan sederhana dalam penilaian semen untuk IB, gerakan individu yang terbaik adalah gerakan progresif maju ke depan. Persentase motilitas semen di bawah 40% menunjukkan semen yang kurang baik dan sering dihubungkan dengan infertilitas.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis ragam dan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan menggunakan paket software IBM SPSS statistics 25 for windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar sapi bali

Karakteristik semen segar yang diperoleh dari 5 kali penampungan memiliki rerata volume

$3,64 \pm 0,93$ mL, konsistensi sedang dan motilitas $77,00 \pm 2,09\%$ (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi bali

Karakteristik semen	Rerata ± standar deviasi
Makroskopis	
Volume (mL)	$3,64 \pm 0,93$
Warna	Krem
Bau	Khas
Konsistensi	Sedang
pH	$6,40 \pm 0,00$
Mikroskopis	
Gerakan Massa	++ - +++
Konsentrasi (x 10^6 sel/mL)	$1062,00 \pm 95,23$
Motilitas (%)	$77,00 \pm 2,09$
Viabilitas (%)	$86,55 \pm 1,05$
Abnormalitas (%)	$5,79 \pm 1,21$

Hasil penilaian semen segar pada Tabel 1 bahwa hasil uji makroskopis dan uji mikroskopis semen segar sapi bali yang ditampung mempunyai kualitas yang baik dan memenuhi persyaratan untuk diencerkan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata volume sperma segar sapi bali adalah $3,64 \pm 0,93$ dengan kisaran 3-5 ml. Dapat dikatakan bahwa hasil tersebut berada dalam kisaran normal. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa volume semen sapi bervariasi, setiap penampungan antara 1-15 mililiter atau 5-8 mililiter setiap ejakulasi. Volume sperma setiap ejakulasi berbeda-beda dapat disebabkan oleh berbagai faktor, misalnya umur, suhu, bangsa, tingkatan makanan,

frekuensi penampungan, ukuran testis dan tubuh ternak. Frekuensi ejakulasi tinggi atau ejakulasi yang terlampau sering dapat menyebabkan penurunan volume.

Warna semen segar adalah krem. Hasil ini sesuai dengan pendapat dari Seuk (2018) bahwa semen sapi biasanya berwarna keputih-putihan atau krem dan ada beberapa jenis sapi yang semennya berwarna agak kuning. Kira-kira 10% sapi menghasilkan semen yang normal dengan warna kekuning-kuningan, yang disebabkan oleh riboflavin yang dibawa oleh satu gen autosom resesif dan tidak mempunyai pengaruh terhadap fertilitas.

Bau yang diperoleh selama penelitian adalah normal, berbau khas sperma ternak. Hal ini sesuai dengan pendapat Nur (2019) yang

menyatakan bahwa semen yang normal pada umumnya memiliki bau khas disertai dengan bau dari ternak itu sendiri. Bau tersebut menunjukkan semen tersebut dalam keadaan normal dan tidak terdapat kontaminasi (Inonie *et al.*, 2016).

Konsistensi semen segar yang diperoleh termasuk dalam kategori sedang. Konsistensi semen sapi dan domba kental dan berwarna krem (Feradis, 2010). Konsistensi semen berkisar dari kental berwarna krem (1.000-2.000 sel spermatozoa per mL), encer berwarna susu (500-600 juta sel spermatozoa per mL), cair dan sedikit keruh (sekitar 100 juta sel spermatozoa per mL) dan jernih seperti air kurang dari 50 juta sel spermatozoa per ml.

Derajat keasaman atau pH semen segar yang diperoleh adalah $6,40 \pm 0,00$. Hasil ini sesuai dengan hasil yang diperoleh Mila *et al.* (2022) yakni pH semen sapi berkisar antara 6,2-6,8. Derajat kesamaan sangat berpengaruh pada daya tahan hidup dari spermatozoa. pH semen segar Sapi Bali yang digunakan sebagai bahan penelitian dapat dikatakan normal. Feradis (2010) menyatakan pH semen dapat berbeda antar bangsa sapi.

Gerakan massa semen segar sapi bali yang diperoleh (Tabel 1) memiliki nilai ++ - +++. Ducha *et al.* (2013) menyatakan bahwa persyaratan gerakan massa semen agar dapat diproses minimal ++. Hasil pengamatan yang diperoleh menunjukkan gerakan massa semen segar sapi angus masih dalam kisaran normal. Konsentrasi sperma pada semen segar dari hasil penelitian ini mencapai $1.062,00 \pm 95,23$ sel/mL. Hasil ini masih termasuk dalam kisaran normal sesuai dengan hasil laporan penelitian Ismaya (2014) yang menjelaskan bahwa konsistensi sedang hingga kental atau warna

krem maka konsentrasi spermatozoa berkisar 1.000-2.000 Juta spermatozoa/mL.

Motilitas merupakan daya gerak spermatozoa untuk sampai ke tempat fertilisasi sekaligus merupakan patokan dalam penilaian kualitas spermatozoa untuk inseminasi buatan. Motilitas sangat penting untuk diketahui demi keberhasilan dari suatu perkawinan. Motilitas spermatozoa sapi bali yang diperoleh pada penelitian ini adalah $77,00 \pm 2,09\%$ menunjukkan motilitas yang cukup tinggi dan dalam kisaran normal. Menurut Toelihere (1993) motilitas individu semen segar yaitu 50-80%.

Viabilitas spermatozoa semen segar sapi yang diperoleh dalam penelitian adalah $86,55 \pm 1,05\%$, hasil ini tidak berbeda jauh dengan hasil penelitian Rizal (2009) yang melaporkan bahwa viabilitas spermatozoa sapi bali sebesar 86,75%, Labetubun dan Siwa (2011) 86,75% dan Siahaan *et al.* (2012) 85%. Menurut pendapat Toelihere (1993) bahwa, semen yang layak digunakan untuk inseminasi buatan (IB) harus memiliki presentase spermatozoa hidup diatas 50%.

Abnormalitas semen sapi bali rata-rata $5,79 \pm 1,21\%$. Dari hasil penelitian persentase abnormalitas menunjukkan bahwa semen segar layak untuk diproses lebih lanjut karena sesuai dengan pernyataan Toelihere (1993) abnormalitas spermatozoa tidak boleh melebihi 20%. Dapat dikatakan kualitas semen segar yang digunakan adalah semen yang memiliki kualitas baik.

Pengaruh perlakuan terhadap motilitas spermatozoa

Motilitas atau daya gerak spermatozoa merupakan salah satu parameter yang digunakan pada penilaian kualitas semen. Rataan motilitas spermatozoa sapi bali berdasarkan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap motilitas spermatozoa (%)

Hari ke	Perlakuan				P _{Value}
	P0	P1	P2	P3	
0	78,50 ± 2,23 ^a	77,00 ± 5,41 ^a	78,50 ± 2,23 ^a	79,00 ± 1,36 ^a	0,780
1	73,00 ± 2,09 ^a	74,00 ± 2,23 ^a	74,50 ± 1,11 ^a	73,00 ± 2,09 ^a	0,538
2	67,50 ± 2,50 ^b	69,00 ± 3,79 ^b	66,00 ± 2,85 ^{ab}	63,00 ± 2,73 ^a	0,036
3	60,50 ± 1,11 ^{ab}	63,00 ± 4,80 ^b	59,50 ± 1,11 ^{ab}	56,50 ± 6,02 ^a	0,112
4	52,50 ± 3,53 ^a	57,00 ± 4,47 ^a	51,50 ± 4,18 ^a	49,00 ± 9,45 ^a	0,228
5	45,00 ± 5,86 ^{ab}	50,00 ± 3,95 ^b	42,50 ± 5,59 ^{ab}	41,00 ± 8,21 ^a	0,142
6	35,50 ± 5,70 ^a	43,50 ± 4,87 ^b	33,50 ± 6,75 ^a	34,00 ± 5,75 ^a	0,051
7	25,50 ± 5,12 ^a	34,50 ± 6,22 ^a	24,00 ± 6,91 ^a	25,00 ± 9,35 ^a	0,164

^{a,b} Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa berbeda tidak nyata ($P>0,05$) pasca pengenceran, setelah penyimpanan satu, empat, dan tujuh hari namun berbeda nyata ($P<0,05$) pada penyimpanan dua, tiga, lima, dan enam hari. Hal ini menandakan bahwa adanya interaksi antara pengencer dan spermatozoa. Penambahan vitamin C dan mineral Zn (Zink) pada P1, P2 dan P3 memberikan pengaruh yang signifikan.

Perlakuan P1 mampu mempertahankan rerata motilitas spermatozoa lebih tinggi yaitu hari pertama $74,00 \pm 2,23\%$, kedua $69,00 \pm 3,79\%$, ketiga $63,00 \pm 4,80\%$, keempat $57,00 \pm 4,47\%$, kelima $50,00 \pm 3,95\%$, keenam $43,50 \pm 4,87\%$, dan ketujuh $34,50 \pm 6,22\%$ dibandingkan P0 yang tanpa ditambahkan mineral Zn (Zink). Tingginya persentase motilitas P1 dibandingkan P0 diduga karena adanya penambahan mineral Zn (Zink) yang berperan sebagai antioksidan yang mampu melindungi sperma dari radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran dan menghambat fosfolifase pada peroksidase lipid. Hal ini didukung oleh pernyataan Iwasaki dan Gagnon (1992) yang menyatakan bahwa pemberian mineral Zn (Zink) dapat meningkatkan motilitas sperma. Mineral Zn (Zink) dapat menyediakan energi gerak bagi sperma sehingga sperma lebih aktif. Mineral Zn (Zink) berfungsi terhadap kerja enzim-enzim metabolisme sel sperma untuk menghasilkan energi (ATP). Mineral Zn (Zink) juga berperan sebagai antioksidan yang mampu melindungi sperma dari radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran dan menghambat fosfolifase pada peroksidase lipid. Mineral Zn (Zink) sebagai antioksidan bertanggung jawab untuk perbaikan motilitas sperma. Melalui suplementasi mineral Zn (Zink), kerusakan akibat oksidasi dapat dikurangi (Syarifuddin *et al.* 2017).

Persentase sperma motil pada perlakuan P0, P2 dan P3 dalam penelitian ini dapat dipertahankan di atas 40% dalam sampai pada penyimpanan hari ke lima yakni berturut-turut sebesar $45,00 \pm 5,86\%$, $42,50 \pm 5,59\%$, dan $41,00 \pm 8,21\%$. Sebaliknya P1 dapat dipertahankan sampai penyimpanan hari ke enam, yakni $43,50 \pm 4,87\%$ (Tabel 2). Motilitas sperma setelah penyimpanan lima hari pada sebesar $42,50 \pm 5,59\%$ dan pada P3 sebesar $41,00 \pm 8,21$ lebih rendah dari P0 sebesar 45,00

$\pm 5,86\%$. Perbedaan ini kemungkinan penambahan vitamin C dalam pengencer sebanyak 0,025-0,05 gram tidak ideal untuk kehidupan spermatozoa. Penurunan motilitas ini diduga berhubungan dengan vitamin C atau asam askorbat yang terkandung di dalamnya bersifat asam dan juga kandungan antioksidan dalam jumlah banyak dapat bersifat prooksidan sehingga akan mengakibatkan penurunan motilitas. Spermatozoa sangat peka terhadap perubahan pH medium dari keadaan netral, terutama terhadap pH rendah. Savitria *et al.* (2014) juga berpendapat bahwa dosis antioksidan yang terlalu banyak dapat berpengaruh terhadap laju oksidasi yang menyebabkan aktivitas antioksidan menghilang bahkan antioksidan yang berlebihan dapat menjadi peroksidan. Pada perlakuan P3 menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa lebih rendah secara tidak nyata ($P>0,05$) dari P0 dan P2 namun lebih rendah secara nyata ($P<0,05$) dari P1. Persentase motilitas P3 terlihat bertahan pada hari ke lima dengan persentase motilitas $41,00 \pm 8,21\%$. Memasuki hari ke enam motilitas P3 berada di bawah 40% dengan nilai $34,00 \pm 5,75\%$. Hasil ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin C 0,025 g dan mineral Zn (Zink) 0,025 g dalam pengencer S-KT dapat menurunkan persentase motilitas. Hal ini diduga karena penambahan vitamin C 0,05 g yang bersifat asam dengan kandungan antioksidan dalam jumlah banyak dapat bersifat peroksidan sehingga akan mengakibatkan penurunan motilitas. Menurut Gordon (1990) besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi, selain itu menambahkan pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi peroksidan.

Pengaruh perlakuan terhadap viabilitas spermatozoa

Viabilitas merupakan daya hidup spermatozoa sebagai indikator kualitas spermatozoa (Sukmawati *et al.*, 2014). Nilai Viabilitas spermatozoa dari hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 3. Dari Tabel 3 dapat dilihat adanya penurunan nilai viabilitas. Namun penurunan tidak sama pada masing-masing perlakuan.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap viabilitas spermatozoa (%)

Hari ke	Perlakuan				P-Value
	P0	P1	P2	P3	
0	87,33 ± 2,66	87,81 ± 3,96	85,35 ± 1,12	86,76 ± 1,36	0,447
1	81,60 ± 4,07	82,86 ± 1,76	81,16 ± 2,15	81,75 ± 3,58	0,837
2	75,13 ± 4,15	77,88 ± 2,86	75,38 ± 4,26	72,92 ± 3,23	0,247
3	69,87 ± 3,96	71,83 ± 7,34	67,39 ± 5,43	67,19 ± 6,36	0,567
4	60,05 ± 3,68	64,42 ± 5,84	61,04 ± 9,16	58,18 ± 8,65	0,586
5	54,69 ± 6,69	57,40 ± 6,58	53,97 ± 9,71	51,75 ± 10,20	0,769
6	34,16 ± 8,84	52,20 ± 6,76	44,93 ± 11,27	43,30 ± 6,72	0,444
7	45,72 ± 10,31	44,71 ± 8,78	35,23 ± 9,86	31,30 ± 9,68	0,162

^{a,b} Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa sebagai indikator kualitas spermatozoa Sukmawati (2014) menyatakan bahwa semakin tinggi presentase viabilitas semen maka semakin baik kualitas semen tersebut. Hasil analisis statistik terhadap viabilitas spermatozoa pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) dari hari 0 sampai dengan hari ke 7. Rerata persentase viabilitas spermatozoa sapi bali dalam pengencer S-KT pada setiap perlakuan mengalami penurunan seiring lama waktu penyimpanan. Pada Tabel 3 terlihat persentase viabilitas spermatozoa sapi bali dalam pengencer S-KT dengan penambahan mineral Zn (Zink) 0,05 g pada perlakuan P1 lebih baik dibandingkan dengan P2 (vitamin C 0,05 g) dan P3 (Zn 0,025 g dan vitamin C 0,025 g) serta P0 tanpa penambahan mineral Zn (Zink) dan vitamin C. Persentase viabilitas pada P1 mampu bertahan sampai hari ke enam dengan nilai $52,20 \pm 6,76\%$ lebih tinggi dibandingkan dengan P0 ($45,72 \pm 10,31\%$), P2 ($44,93 \pm 11,27\%$) dan P3 ($43,30 \pm 6,72\%$). Hal ini menunjukkan peranan dari mineral Zn (Zink) terhadap kerja enzim-enzim metabolisme sel sperma untuk menghasilkan energi (ATP) serta berperan sebagai antioksidan yang mampu melindungi sperma dari radikal bebas. Nutrisi akan digunakan oleh spermatozoa untuk dijadikan energi sehingga apabila kebutuhan nutrisi spermatozoa berkurang maka akan mengakibatkan viabilitas spermatozoa menurun. Dalam penelitian ini digunakan pengencer S-KT yang dapat mengendalikan larutan penyanggah dalam mempertahankan pH larutan. Sitrat berperan sebagai buffer yang berfungsi untuk mempertahankan pH selama proses penyimpanan pada suhu dingin untuk preservasi daya tahan hidup dan fertilitas spermatozoa (Garner dan Hafez, 2000). Salisbury (1984) menyatakan

bahwa Citrate natricus akan mengikat kalsium dengan logam-logam berat lainnya dan menyebabkan butiran-butiran lemak di dalam sel-sel sperma dapat diobservasi dibawah mikroskop. Kuning telur berfungsi sebagai pelindung spermatozoa terhadap kejutan dingin/cold shock dan sebagai sumber energi bagi pergerakan spermatozoa. Komposisi utama kuning telur adalah terdiri dari air, lemak, karbohidrat, mineral, vitamin dan protein, termasuk sempurna karena mengandung semua jenis asam amino esensial dalam jumlah yang cukup besar, selain itu kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin yang dapat melindungi sel spermatozoa dari kejutan dingin (Kommissrud *et al.*, 2002)

Pada Tabel 3 menunjukkan bahwa ketersediaan mineral Zn (Zink) 0,05 g dalam pengencer SKT dapat mempertahankan persentase viabilitas spermatozoa. Hal ini disebabkan karena mineral Zn (Zink) berperan sebagai antioksidan mampu melindungi spermatozoa dari radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran dan menghambat fosfolipase pada peroksidase lipid (Syarifuddin *et al.*, 2017). Pemberian mineral Zn meningkatkan motilitas sperma, mengaktifkan kerja enzim metabolisme untuk menghasilkan energi yang bagi aktifitas gerak spermatozoa. Spermatozoa dengan motilitas tinggi memiliki peluang yang tinggi untuk membuahi (fertilisasi).

Selama pengamatan terjadi penurunan viabilitas di setiap perlakuan. Hal ini dapat terjadi karena berbagai faktor misalnya secara almah sel akan mengalami kematian, sperma mengalami stress pada waktu pengenceran dan sperma segar mengalami penurunan kualitas dan jumlah sperma mati lebih banyak setelah penyimpanan 2 hari (Yani *et al.*, 2001).

Pemberian dosis mineral (Zn) 0,05 ini didukung oleh penelitian terdahulu oleh Payaran *et al.* (2014) pada mencit dengan dosis 10 mg, 20 mg, 30 mg, dengan dosis terbaik 30 mg yang jika dikonversikan ke gram menjadi 0,03 g. Penelitian pada sapi diberikan dengan dosis yang lebih besar dibandingkan pada mencit karena volume dan konsentrasi spermatozoa pada sapi lebih banyak dibandingkan pada mencit.

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). Nilai anormalitas spermatozoa sapi bali selama penelitian disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan terhadap abnormalitas spermatozoa (%)

Hari ke	Perlakuan				P-Value
	P0	P1	P2	P3	
0	3,98 ± 0,76	3,54 ± 0,83	3,99 ± 0,74	4,35 ± 1,40	0,631
1	4,09 ± 0,80	3,86 ± 0,71	4,11 ± 0,55	3,93 ± 0,75	0,928
2	3,87 ± 1,25	4,01 ± 0,75	4,74 ± 1,50	4,23 ± 0,82	0,639
3	4,31 ± 1,29	4,35 ± 0,89	4,85 ± 1,09	4,80 ± 1,00	0,791
4	4,49 ± 1,25	4,29 ± 0,98	4,79 ± 0,96	4,98 ± 1,14	0,764
5	4,39 ± 1,54	4,60 ± 0,89	4,64 ± 1,36	4,93 ± 1,25	0,927
6	4,65 ± 1,72	4,74 ± 1,14	4,98 ± 1,39	5,06 ± 1,08	0,958
7	5,14 ± 1,45	5,15 ± 0,92	5,53 ± 1,37	5,35 ± 1,01	0,950

^{a,b} Superskrip dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Hasil analisis statistik terhadap abnormalitas pada semua perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) dari hari 0 sampai dengan hari ke 7. Rerata persentase abnormalitas spermatozoa dalam semua dan setiap perlakuan pengencer mengalami kenaikan selama waktu penyimpanan.

Tabel 4 menunjukkan bahwa kenaikan persentase abnormalitas tidak terlalu drastis dan tergolong rendah dimana terlihat pada pengamatan hari ke 0 sampai pengamatan hari ke 7 setelah penyimpanan pada suhu 3-5oC menunjukkan rentang persentase abnormalitas berada dalam kisaran normal yaitu kurang dari 20% dengan kisaran persentase abnormalitas $3,54 \pm 0,83 - 5,53 \pm 1,37\%$. Menurut BSN (2017) penggunaan semen segar maupun semen beku dalam program inseminasi abnormalitas spermatozoa sebaiknya kurang dari 20%. Rendahnya persentase kenaikan abnormalitas sapi bali pada suhu 5oC dalam penelitian ini diduga dipengaruhi oleh lipoprotein yang terdapat dalam kuning telur yang memiliki fungsi pelindung terhadap spermatozoa melawan cold shock/kejutan dingin. Hasil ini sesuai dengan pendapat dari Afiati *et al.* (2015), yang menyatakan terjadinya peningkatan nilai abnormalitas spermatozoa disebabkan oleh efek cekaman dingin (cold shock) dan ketidakseimbangan nutrisi.

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa persentase kenaikan abnormalitas pada P0 lebih rendah dibandingkan dengan P1, P2 dan P3. Tingginya persentase abnormalitas spermatozoa pada P1, P2, dan P3 diduga penambahan mineral Zn (Zink) tidak memengaruhi abnormalitas serta vitamin C yang bersifat asam. Rendahnya persentase daya tahan hidup dapat disebabkan oleh adanya aktivitas metabolisme spermatozoa yang membentuk asam laktat dalam media pengencer (Rhoyan *et al.*, 2014). Kynaston *et al.* (1988) menyatakan bahwa suplementasi mineral Zn (Zink) tidak mempengaruhi abnormalitas spermatozoa. Jenis abnormalitas yang di dapat selama penelitian adalah abnormalitas sekunder, berupa ekor dan kepala terpisah. Menurut Firdausi *et al.*, (2014) kerusakan pada spermatozoa dapat diakibatkan saat pembuatan ulasan di object glass sehingga abnormalitas yang terbentuk adalah spermatozoa dengan ekor yang patah atau kepala tanpa ekor.

Pengaruh Perlakuan Terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa

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

Tabel 5. Pengaruh perlakuan terhadap daya tahan hidup spermatozoa (%)

Perlakuan	Daya Tahan Hidup (Hari)
P0	5,40±0,54 ^{ab}
P1	6,40±0,89 ^b
P2	5,00±0,70 ^a
P3	4,60±1,14 ^a
P-Value	0,024

^{a,b}Superskrip dengan huruf 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. Perlakuan P1 menunjukkan bahwa daya tahan hidup spermatozoa lebih lama yaitu dengan lama penyimpanan 6,40 hari diikuti perlakuan P0: 5,40 hari, P2: 5,00 hari, dan P3: 4,60 hari. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh ketiadaan dan perbedaan dosis unsur pelindung di dalam pengencer sperma sehingga saat spermatozoa disimpan pada suhu yang rendah maka daya tahan hidup setiap perlakuan berbeda.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan P1 dapat menjaga daya tahan hidup sampai 6,40 hari dibandingkan P0 yaitu 5,40 hari. Hal ini diduga karena P0 tidak memiliki unsur pelindung spermatozoa seperti antioksidan sehingga tidak mampu mencegah atau mengurangi kerusakan akibat radikal bebas. Penambahan mineral Zn (Zink) 0,05 g dalam

pengencer S-KT pada P1 mampu mencegah kerusakan akibat radikal bebas. Hal ini didukung oleh pernyataan Payaran *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa mineral Zn (Zink) menghasilkan sistem enzim yang membantu menetralkan radikal bebas.

Pada Tabel 5 daya tahan hidup spermatozoa terendah terlihat pada perlakuan P3 dengan lama penyimpanan 4,60 hari. Daya tahan hidup spermatozoa pada P3 dan P2 dari perlakuan yang lain yaitu P0 dan P1 disebabkan oleh aktivitas asam yang berlebihan terutama pada vitamin C yakni asam askrobat yang menyebabkan perubahan pH. Rendahnya persentase daya tahan hidup dapat disebabkan oleh adanya aktivitas metabolisme spermatozoa yang membentuk asam laktat dalam media pengencer (Rhoyan *et al.*, 2014). Akumulasi asam laktat yang berlebihan akan bersifat toksik bagi spermatozoa (Varasofiari *et al.*, 2013).

SIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan mineral Zn (Zink) 0,05g dalam pengencer S-KT memberikan efek yang cukup

baik dalam menjaga kualitas spermatozoa sapi bali sampai penyimpanan hari ke enam.

SARAN

Saran untuk penelitian ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menguji keberhasilan dalam pelaksanaan

inseminasi buatan menggunakan pengencer S-KT yang ditambahkan 0,05 g mineral Zn (Zink).

DAFTAR PUSTAKA

- Abbasi AA, Prasad AS, Rabbani P, DuMouchelle E. 1980. Experimental zinc deficiency in man: effect on testicular function. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 96(3) : 544–550.
- Afiati F, Herdis, Said S. 2013. *Pembibitan Ternak dengan Inseminasi Buatan*. Penebar Swadaya.
- Afiati F, Yulnawati MR, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *In: Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1(4) : 930–934. [10.13057/psnmbi/m010449](https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010449)
- Aslam HA, Dasrul, Rosmaidar. 2014. Pengaruh penambahan vitamin C dalam pengencer

- andromed terhadap persentase motilitas dan membran plasmata utuh spermatozoa sapi Aceh setelah pembekuan. *Jurnal Medika Veterinaria*, 8(1) : 20–26.
[10.21157/j.med.vet.v8i1.3326](https://doi.org/10.21157/j.med.vet.v8i1.3326)
- 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.
<https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.555>
- Faradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Cetakan ke satu. 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* 15(1) : 21–30.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In : Hafez B, Hafez ESE, Reproduction in Farm Animals. Pp: 96-109.
<https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>
- Gordon MH. 1990. *The Mechanism of Antioxidants Action in Vitro*. Elsevier Applied Food Science Series, London.
[10.1007/978-94-009-0753-9_1](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0753-9_1)
- 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
- Inonie RI, Baa LO, Saili T. 2016. Kualitas spermatozoa kambing boerawa dan kambing kacang pada penggunaan tris-kuning telur yang berbeda. *JITRO*, 3(1) : 52–64.
<https://doi.org/10.33772/jitro.v3i1.1070>
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Gadjah Mada University Press.
- Iwasaki AMD, Gagnon C. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 57(2) : 409-416.
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)54855-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)54855-9)
- Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43(1) :49-55.
<https://doi.org/10.1186/1751-0147-43-49>
- Kynaston HG, Lewis-Jones DI, Lynch RV, dan Desmond AD. 1988. Changes in seminal quality following oral zinc therapy. *Andrologia*, 20(1) : 21–22.
[10.1111/j.1439-0272.1988.tb02355.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1988.tb02355.x)
- 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.
<https://ojs.unud.ac.id/index.php/jvet/article/view/3511>
- Mila FNH, Ina YT, Kaka A. 2022. Karakteristik dan kualitas semen sapi sumba ongole dalam pengencer tris yang disuplementasi dengan susu skim pada suhu 3-5°C. *Jurnal Sains dan Teknologi Peternakan* 3(1) : 12-18.
<https://doi.org/10.31605/jstp.v3i1.1201>
- Nur NE. 2019. Pengaruh pengencer tris kuning telur itik dan konsentrasi spermatozoa berbeda terhadap kualitas semen sapi bali. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
- Payaran KO, Wantouw B, Tendean L. 2014. Pengaruh pemberian zink terhadap kualitas spermatozoa pada mencit jantan (*Mus musculus*). *Jurnal e-Biomedik* 2(2) : 496-500.
<https://doi.org/10.35790/ebm.2.2.2014.5044>
- Pubiandara S, Suharyati S, Hartono M. 2016. Pengaruh penambahan dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur terhadap motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa sapi ongole. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 4(4) : 292-299.
<https://doi.org/10.23960/jipt.v4i4.1396>
- Rhoyan YH, Lestari TD, dan Setiawan R. 2014. Kualitas semen cair dingin domba garut pada tiga jenis larutan pengencer. *Jurnal Ilmu Ternak*, 14(1) : 63–67.
[10.24198/jit.v14i1.5150](https://doi.org/10.24198/jit.v14i1.5150)

- 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.
<https://doi.org/10.14334/jitv.v14i2.355>
- Salisbury, G. W. 1984. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi*. Gadjah Mada University Press.
- Savitria FK, Suharyati S, Siswanto. 2014. Kualitas semen beku sapi bali dengan penambahan berbagai dosis vitamin C pada bahan pengencer skim kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2 (3) : 30-36.
<http://dx.doi.org/10.23960/jipt.v2i3.p%25p>
- Seuk, MO. 2018. Pengaruh frekuensi penampungan terhadap kualitas spermatozoa sapi bali. *Journal of Animal Sains*, 3(4) : 51–53.
<https://doi.org/10.32938/ja.v3i4.540>
- Siahaan EA, Laksmi, DNDI, Bebas W. 2012. Efektivitas penambahan berbagai konsentrasi β -karoten terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi bali post thawing. *Indonesia Medicus Veterinus* 1 (2) : 239–251..
- Sukmawati E, Arifiantini RI, Purwantara B. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis sapi pejantan unggul. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 19(3) : 168-175.
<https://doi.org/10.14334/jitv.v19i3.1079>
- Syarifuddin NA, Toleng AL, Rahardja DP, Ismartoyo, Yusuf M. 2017. Daun kelor sumber mineral seng (Zn) untuk meningkatkan libido dan kualitas semen pejantan sapi bali. In : *Prosiding Seminar Nasional Lahan Basah*. Banjarmasin, 5 November 2016. pp: 180–186.
<http://eprints.ulm.ac.id/id/eprint/2785>
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
<https://lib.ui.ac.id/detail.jsp?id=141995>
- Toelihere MR. 2006. Pokok-pokok pikiran tentang perkembangan bioteknologi reproduksi di masa lalu, masa kini dan masa yang akan datang dalam menunjang pembangunan peternakan di Indonesia. In : *Seminar Nasional Peranan Bioteknologi Reproduksi dalam Pembangunan Peternakan di Indonesia*. Fakultas Kedokteran Hewan-IPB Bogor, April 2006.
- Varasofiari LN, Setiatin ET, Sutopo D. 2013. Evaluasi kualitas semen segar sapi jawa brebes berdasarkan lama waktu penyimpanan. *Animal Agriculture Journal*, 2(1) : 201–208.
<http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/aaj>.
- Yani A, Nuryadi, Pratiwi T. 2001. Pengaruh tingkat substitusi santan kelapa pada pengencer tris dan waktu penyimpanan terhadap kualitas semen kambing peranakan ettawah (PE). *Jurnal Biosain* 1(1):23-29.