

## PENGARUH LEVEL ZINK DALAM PENGECER TRIS KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR SAPI ANGUS

*(The effect of zinc level in the tris egg yolk extender on the quality of angus liquid semen)*

**Sofia Maria S. Siena\***, Thomas Mata Hine, W. Marlene Nalley, Aloysius Marawali

Fakultas Peternakan Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana,  
Jalan Adisucipto Penfui, Kupang 85001

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

### ABSTRAK

Upaya perbaikan produktivitas ternak sapi bisa dilakukan dengan menggunakan teknologi inseminasi buatan (IB). Banyak faktor penentu keberhasilan IB, salah satunya adalah pengencer yang digunakan dalam preservasi semen. Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui pengaruh level zink dalam pengencer tris-kuning telur (T-KT) terhadap kualitas semen cair sapi Angus. Semen ditampung satu kali per minggu menggunakan metode vagina buatan dari seekor sapi Angus jantan yang berumur tiga tahun dalam keadaan tubuh serta organ reproduksi yang tidak ada kelainan atau sehat. Semen diencerkan dengan pengencer T-KT yang sudah ditambah dengan Zink pada beberapa level, 0 mg perlakuan kontrol.(P0), 10 mg.(P1), 20 mg.(P2), 30 mg.(P3), 40 mg (P4) per 100 mL pengencer. Semen yang selesai diencerkan disimpan dalam suhu 3-5°C, kemudian diamati tiap 24 jam akan motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa sampai motilitas minimum 40%. Hasil penelitian menyatakan bahwa penambahan zink sebanyak 20 mg didalam pengencer T-KT (P2) menghasilkan kualitas semen cair sapi Angus yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) daripada perlakuan lainnya. Kualitas semen cair (motilitas, viabilitas, abnormalitas serta daya tahan hidup spermatozoa) secara berturut-turut adalah motilitas  $44 \pm 5,75$  %, viabilitas  $48,39 \pm 13,59$ %, abnormalitas  $6,91 \pm 1,85$ % dan daya tahan hidup  $5,60 \pm 0,89$  hari. Disimpulkan bahwa penambahan zink sebanyak 20 mg didalam pengencer tris-kuning telur menghasilkan semen cair sapi Angus dengan kualitas yang lebih tinggi dari perlakuan lainnya.

**Kata-kata kunci:** kuning telur, sapi Angus, spermatozoa, tris, zink

### ABSTRACT

Efforts to improve cattle productivity can be done by using artificial insemination (AI) technology. Many factors determine the success of AI, one of which is the diluent used in semen preservation. The purpose of this study was to determine the effect of zinc level in tris-egg yolk diluent (T-EY) on the quality of liquid semen of Angus bull. Semen is collected once a week using an artificial vaginal method from a three-year-old Angus bull in an undisturbed or healthy body and reproductive organs. Semen was diluted with T-EY diluent which had been added with zinc at several levels, 0 mg control treatment (T0), 10 mg (T1), 20 mg (T2), 30 mg (T3), 40 mg (T4). The diluted semen was stored at a temperature of 3-5°C, then observed every 24 hours for motility, viability, abnormalities and survival of spermatozoa to a minimum motility of 40%. The results showed that the addition of 20 mg of zinc in the T-EY diluent (T2) resulted in a higher quality of liquid semen of Angus bull ( $P < 0.05$ ) than other treatments. The quality of the liquid semen (motility, viability, abnormalities and survival of spermatozoa) were motility  $44 \pm 5.75\%$ , viability  $48.39 \pm 13.59\%$ , abnormality  $6.91 \pm 1.85\%$  and durability live  $5.60 \pm 0.89$  days. It was concluded that the addition of 20 mg zinc in the tris-egg yolk diluent produced liquid semen of Angus bull with higher quality than other treatments.

**Keywords:** egg yolk, Angus bull, spermatozoa, tris, zinc

### PENDAHULUAN

Produktivitas yang tinggi merupakan satu diantara penentu keberhasilan pada suatu usaha peternakan. Upaya perbaikan produktivitas ternak sapi dapat dilakukan dengan

menggunakan teknologi inseminasi buatan (IB). Salah satu faktor penentu keberhasilan IB yakni pengencer yang digunakan dalam presevasi semen. Pengenceran semen dilakukan untuk

mengurangkan konsentrasi spermatozoa serta mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa (Widjaya, 2011). Syarat bahan pengencer yang baik bagi spermatozoa adalah dapat menyediakan sumber energi bagi spermatozoa, dapat menjadi buffer atau penyangga, tidak menghambat pergerakan spermatozoa serta tidak bersifat racun atau toksik, sehingga mengurangi bahaya asam laktat yang disebabkan oleh sisa metabolisme (Foeh dan Gaina, 2017). Selain itu, pengencer juga memiliki fungsi untuk menambah volume semen sehingga makin banyak jumlah ternak yang bisa diinseminasi (Susilawati, 2011).

Beberapa pengencer telah digunakan untuk mengencerkan semen, salah satunya adalah Tris kuning telur (T-KT) adalah pengencer yang paling sering digunakan pada ternak sapi dalam laporan Blegur *et al.* (2020), ternak domba pada laporan Nurcholis dan Yamin (2016) dan pada ternak kambing (Siswandoko *et al.*, 2017). Tris adalah larutan yang memiliki kandungan asam sitrat dan fruktosa yang berperan sebagai penyangga (*buffer*), dengan tujuan mencegah terjadinya perubahan pH akibat asam laktat hasil metabolisme spermatozoa dan mempertahankan tekanan osmotik serta keseimbangan elektrolit, sumber energi dan menjaga spermatozoa dari *cold shock* (Widjaya, 2011). Pengencer T-KT mempunyai kandungan yang relatif lengkap Tris (*hydroxymethyl*) *aminometan*, asam sitrat dan fruktosa. Kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan serta melindungi spermatozoa dari cekaman dingin (Permatasari *et al.*, 2013). Kuning telur mengandung asam amino, karbohidrat, vitamin dan kebutuhan hidup bagi spermatozoa. Kuning telur juga mengandung glukosa, protein, vitamin yang larut dalam air dan lemak serta viskositasnya yang dapat menguntungkan bagi spermatozoa (Wawang *et al.*, 2024).

Selama proses penyimpanan, zat-zat yang terkandung didalam pengencer dapat mengalami oksidasi dan menyebabkan peningkatan kadar radikal bebas yang bisa merusak spermatozoa (Wiyanti *et al.*, 2013). Selain itu, spermatozoa yang aktif secara metabolik juga dapat menghasilkan sejumlah besar radikal bebas. Dalam mengurangi kerusakan spermatozoa dalam proses penyimpanan, diperlukannya penambahan antioksidan yang bisa mengikat senyawa radikal bebas yang dapat menghambat reaksi peroksidasi lipid yang membentuk membran plasma spermatozoa (Blegur *et al.*, 2020). Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut bisa diredam (Binuni *et al.*, 2020). Penambahan antioksidan didalam pengencer dilakukan untuk mengurangi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap membran spermatozoa (Savitri dan Suharyati, 2014).

Zink adalah konstituen dari superperoksida dismutase, suatu enzim yang berperan sebagai antioksidan endogen yang mampu menjaga sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Payaran *et al.*, 2014). Laporan penelitian Payaran *et al.* (2014) menyatakan bahwa penambahan zink sebanyak 30 mg dapat mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses penyimpanan. Penggunaan sapi Angus sebagai sumber semen dalam penelitian ini didasari oleh keunggulan yang dimiliki oleh sapi Angus, yakni dapat beradaptasi dengan pakan yang memiliki mutu rendah serta daerah tropis di Indonesia khususnya di NTT. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh level zink terbaik dalam pengencer tris-kuning telur (T-KT) terhadap kualitas semen cair sapi Angus.

## METODE PENELITIAN

### Materi Penelitian

Semen diperoleh dari ternak sapi Angus yang berumur tiga tahun dalam kondisi yang sehat dan sudah terlatih dalam penampungan semen. Ternak yang digunakan mendapatkan pemeliharaan dalam kandang individu yang sudah lengkap dengan tempat makan dan minum. Pakan hijauan diberikan 10% dan konsentrat 0,5 Kg dari bobot badan.

### Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan percobaan yaitu rancangan acak lengkap, yang terdiri atas 5 perlakuan dan 5 ulangan (penampungan semen) sehingga membentuk 25 unit percobaan. Perlakuannya adalah level zinc per 100 mL pengencer, yang diperinci sebagai berikut: P0= Tris-kuning telur (T-KT) + Zink 0 mg, P1= T-

KT + Zink 10 mg, P2= T-KT + Zink 20 mg, P3= T-KT + Zink 30 mg dan P4= T-KT + Zink 40 mg.

### Penyiapan Bahan Pengencer

Penyiapan larutan tris. Tris (hydroxymethyl) aminometane ditimbang sebanyak 3,634 g, asam sitrat 1,99 g, fruktosa 0,50 g, dan dilarutkan dengan menggunakan aquadest sebanyak 100 mL didalam tabung erlenmeyer.

Penyiapan kuning telur. Telur dibersihkan menggunakan kapas yang telah ditetesi dengan alkohol dengan kadar 70% agar steril kemudian

dipecahkan dibagian yang lancip dan pisah kuning telur dengan putih telur. Kuning telur yang masih terbungkus selaput vitellin ditempatkan pada kertas saring supaya menyerap putih telur yang tersisa. Kuning telur dipecahkan dengan cara menyobek jaringan vitellin lalu dengan perlahan kuning telur dituangkan dalam gelas ukur.

Larutan Tris sebanyak 80% kemudian ditambahkan kuning telur 20% dan dicampur hingga homogen untuk menghasilkan pengencer tris-kuning telur; selanjutnya tambahkan antibiotik streptomisin dan penisilin (Tabel 1).

Tabel 1. Komposisi bahan pengencer (100 mL)

Bahan	Perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
Tris (mL)	80	80	80	80	80
Kuning Telur (mL)	20	20	20	20	20
Penisilin (IU mL <sup>-1</sup> )	1000	1000	1000	1000	1000
Streptomisin (mg mL <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1
Zink (mg)	0	10	20	30	40

### Penampungan dan Evaluasi Semen

Proses penampungan semen menggunakan metode vagina buatan. Semen segar yang didapat segera dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi secara makroskopis mencakup : (1) volume dan warna semen yang bisa dibaca dan dilihat langsung dalam tabung penampungan berskala, (2) konsistensi/kekentalan semen yang bisa diketahui dengan memiringkan tabung yang berisikan semen secara perlahan-lahan dan melihat pergerakan semen yang kembali lagi pada posisi semula. Cepat atau lambatnya gerakan semen menuju ke posisi semula menunjukkan konsistensinya (encer, sedang atau kental). (3) Derajat keasaman atau pH semen bisa diketahui yaitu dengan diteteskannya semen pada kertas indikator pH. Pergantian warna pada kertas akan dicocokkan dengan standart warna pada kertas indikator.

Evaluasi semen secara mikroskopis mencakup : a) Gerakan massa spermatozoa yang memiliki 4 kategori, yaitu pergerakan massa spermatozoa yang serupa dengan awan tebal serta bergerak cepat diberikan skor (+++), pergerakan massa spermatozoa awan tebal serta bergerak sedikit lambat diberikan skor (++) , pergerakan massa spermatozoa yang serupa

dengan awan tipis serta bergerak lambat diberikan skor (+), pergerakan spermatozoa sangat sedikit atau tidak adanya pergerakan individual diberi skor N (necrospermia atau 0). b) Konsentrasi spermatozoa : menerangkan total sel spermatozoa per satuan volume semen. Konsentrasi spermatozoa dihitung menggunakan haemocytometer pada mikroskop dengan pembesaran 10×40. Perhitungan konsentrasi menggunakan rumus:  $X = \frac{\text{Jumlah spermatozoa}}{\text{hasil perhitungan}}$ . c) Motilitas spermatozoa : diperoleh melalui pengamatan spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran lensanya 10×40. Nilai motilitas dimulai dari 0 (nol) persen (spermatozoa bergerak progresif ke depan tidak ada) sampai dengan 100% (semua spermatozoa bergerak progresif ke depan) serta memiliki kisaran penilaian 5%. d) Viabilitas spermatozoa : dihitung berdasarkan banyaknya spermatozoa hidup yang menggunakan metode pewarnaan yang berwarna merah (eosin-negrosin). Spermatozoa yang hidup ditunjukkan dengan spermatozoa tidak menyerap cairan eosin-negrosin (tetap bening atau putih), sedangkan spermatozoa yang mati dapat menyerap warna merah ungu. Perhitungan nilai viabilitas dilakukan dibawah mikroskop

dengan pembesaran 10×40 dengan rumus: . e) Abnormalitas..spermatozoa : dapat diketahui melalui cara yang sama dalam perhitungan viabilitas dengan menggunakan rumus : .

### Variabel Penelitian

Variabel yang diukur pada penelitian ini yaitu : (a) motilitas spermatozoa (%) merupakan penilaian terhadap persentase spermatozoa yang bergerak secara progresif..dengan kisaran angka penilaian 0-100%, (b) viabilitas spermatozoa (%) merupakan pengamatan pada spermatozoa hidup yang memiliki kepala putih karena tidak menyerap larutan eosin-negrosin, (c)

abnormalitas spermatozoa (%) merupakan pengamatan spermatozoa abnormal yang terjadi pada bagian kepala atau ekor spermatozoa, (d) daya.tahan hidup spermatozoa (hari) merupakan penilaian spermatozoa yang dapat bertahan dalam penyimpanan serta memiliki persentase motilitas minimum 40%.

### Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian hitung rata-rata serta standart deviasinya dan..dianalisis menggunakan analysis of variance (ANOVA).serta.dilanjutkan.dengan uji Duncan. Analisis menggunakan software SPSS 22 for windows.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar

Semen yang digunakan sebagai materi penelitian adalah semen yang berkualitas baik yakni memiliki motilitas sperma progresif  $\geq 70$

persen dan abnormalitas sperma  $< 20$  persen. Karakteristik semen segar sapi Angus yang diperoleh selama penelitian disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik.semen segar.sapi Angus

Karakteristik Semen	Rerata $\pm$ standar deviasi
Volume (mL)	3,36 $\pm$ 0,59
Warna	Krem
Konsistensi	Encer-sedang
pH	6,52 $\pm$ 0,16
Gerakan Massa spermatozoa (+)	++-+++
Konsentrasi spermatozoa (x10 <sup>6</sup> sel/mL)	1.127,60 $\pm$ 202,38
Motilitas.spermatozoa (%)	77,50 $\pm$ 2,50
Viabilitas.spermatozoa (%)	86,11 $\pm$ 1,55
Abnormalitas.spermatozoa (%)	6,54 $\pm$ 1,03

Rataan untuk volume semen segar sapi Angus yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 3,36 $\pm$ 0,59 dengan kisaran 2,8-4,0 mL. Volume semen masih pada kisaran yang normal volume..normal semen.sapi berkisar diantara 2-8 mL (Barszcz *et al.*, 2012). Menurut Ax *et al.* (2008), volume semen dipengaruhi oleh umur serta frekuensi penampungan. Frekuensi penampungan serta ejakulasi yang berlebihan dapat menyebabkan penurunan jumlah semen yang diperoleh serta kualitasnya (Seuk, 2018).

Warna dari semen segar sapi Angus yang diperoleh adalah crem, warna semen dengan penampungan putih susu dan krem termasuk dalam kriteria warna semen yang baik dan normal (Arifiantini *et al.*, 2020). Johnson *et al.* (2000), menjelaskan bahwa berbagai faktor yang berpengaruh terhadap warna semen adalah tingkat rangsangan, frekuensi ejakulasi serta mutu pakan. Pada persiapan sebelum

penampungan semen, yaitu memperlakukan pejantan sapi dengan baik serta hati-hati agar mampu memberikan rangsangan yang baik.

Konsistensi semen segar hasil penelitian yakni memiliki kisaran encer-sedang. Warna, konsentrasi dan konsistensi spermatozoa memiliki ikatan yang erat, apabila semen yang diperoleh encer maka konsentrasi spermatozoa akan menjadi rendah dan warna semen akan menjadi pudar (Suyadi dan Rachmawati, 2012). Salah satu faktor yang memengaruhi konsistensi semen merupakan tingkat rangsangan (Johnson *et al.*, 2000). Semakin baik rangsangan yang diberikan pada waktu penampungan, maka semakin baik pula konsistensi semen yang diperoleh. Derajat keasaman atau pH semen segar yang didapat pada penelitian ini yaitu 6,52 $\pm$ 0,16. Derajat keasaman yang diperoleh masih tergolong pH normal berdasarkan Garner

and Hafez (2016) dimana kisaran pH semen sapi yaitu 5,9-7,3.

Gerakan massa spermatozoa yang didapatkan mempunyai nilai ++++-. Hasil yang diperoleh sama dengan kriteria gerakan massa spermatozoa menurut Ax *et al.* (2008) yaitu (+++) dengan pergerakan koloni spermatozoa amat cepat serta tebal dan nilai (++) dengan pergerakan cepat akan tetapi tipis atau tidak amat tebal. Rataan konsentrasi spermatozoa dalam kategori normal yakni 1.127,60±202,38 juta/mL. Hasil penelitian ini selaras dengan pernyataan Garner and Hafez (2016) yang menjelaskan bahwa konsentrasi spermatozoa adalah memiliki kisaran antara 800-2.000 juta/mL.

Rataan motilitas spermatozoa 77,50±2,50%. Motilitas spermatozoa yang didapatkan pada penelitian ini telah memenuhi syarat, dimana berdasarkan pernyataan Garner and Hafez (2016) motilitas spermatozoa sapi dapat berkisar antara 40-75%, serta agar bisa dilakukannya proses pengenceran serta

pembekuan, maka semen segar wajib memenuhi syarat minimal 70%. Viabilitas spermatozoa sapi yang didapat yaitu 86,11±1,55%. Viabilitas spermatozoa sapi Angus dalam penelitian ini mendekati viabilitas spermatozoa hasil penelitian Blegur *et al.* (2020) pada sapi bali yaitu 81,07%, Sapi limousine 93% (Kusumawati *et al.*, 2018) dan sapi madura 95,4% (Romadhoni *et al.*, 2014).

Abnormalitas spermatozoa yang diperoleh adalah 6,54±1,03%. Hasil abnormalitas menerangkan bahwa semen segar sapi Angus yang diperoleh dapat dipergunakan dalam tindakan lebih lanjut, berdasarkan Garner and Hafez (2016) persentase abnormalitas spermatozoa tidak boleh lebih dari 20%.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Rata-rata nilai motilitas spermatozoa sapi Angus pada setiap perlakuan tercantum dalam Tabel.3.

Tabel 3. Motilitas spermatozoa sapi Angus pasca preservasi pada pengencer T-KT dengan beberapa level zink

ari ke	Perlakuan					p-value
	P0	P1	P2	P3	P4	
1	77,00±2,74 <sup>a</sup>	77,00±2,74 <sup>a</sup>	77,00±2,74 <sup>a</sup>	77,00±2,74 <sup>a</sup>	77,00±2,74 <sup>a</sup>	1.000
2	70,90±2,79 <sup>b</sup>	72,00±2,74 <sup>b</sup>	71,00±2,24 <sup>b</sup>	68,00±2,74 <sup>ab</sup>	66,00±5,48 <sup>a</sup>	0.060
3	61,00±2,24 <sup>b</sup>	64,50±4,48 <sup>b</sup>	66,00±2,24 <sup>b</sup>	61,00±2,24 <sup>b</sup>	53,50±9,29 <sup>a</sup>	0.007
4	52,50±2,50 <sup>b</sup>	54,00±5,48 <sup>b</sup>	58,00±4,48 <sup>b</sup>	52,00±4,10 <sup>b</sup>	44,00±8,94 <sup>a</sup>	0.012
5	42,50±2,50 <sup>ab</sup>	48,50±6,02 <sup>bc</sup>	51,00±4,18 <sup>c</sup>	44,00±5,48 <sup>abc</sup>	38,00±6,94 <sup>a</sup>	0.008
6	33,00±4,47 <sup>a</sup>	38,00±4,80 <sup>ab</sup>	44,00±5,75 <sup>b</sup>	35,50±5,70 <sup>a</sup>	32,00±5,70 <sup>a</sup>	0.014
7	23,00±4,47 <sup>a</sup>	30,00±9,35 <sup>ab</sup>	37,00±6,71 <sup>b</sup>	25,50±7,98 <sup>a</sup>	21,50±4,87 <sup>a</sup>	0.014
8	13,00±5,42 <sup>a</sup>	21,50±10,84 <sup>a</sup>	29,00±10,84 <sup>a</sup>	18,00±7,58 <sup>a</sup>	11,50±3,35 <sup>a</sup>	0.020

<sup>a,b,c,d</sup> Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata. (P<0,05)

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa dengan bertambahnya durasi waktu penyimpanan, terjadi penurunan persentase motilitas spermatozoa pada setiap perlakuan dengan nilai yang berbeda. Rataan penurunan motilitas spermatozoa pada perlakuan kontrol (P0) adalah 8,00%, P1:6,937%, P2:6%, P3:7,375% dan P4:8,187%. Dengan demikian, penurunan persentase motilitas spermatozoa terendah terjadi perlakuan P2 dan tertinggi pada perlakuan P4. Tingginya penurunan persentase motilitas sperma pada perlakuan P4 dapat disebabkan oleh kadar zinc yang ditambahkan ke dalam bahan pengencer terlalu berlebihan sehingga keberadaan zinc di dalam pengencer justru memberikan efek negatif terhadap motilitas sperma. Menurut Sotler *et al.* (2019)

bahwa antioksidan dapat berubah menjadi prooksidan ketika berada dalam jumlah yang berlebihan.

Hasil analisis statistik terhadap motilitas spermatozoa pada hari penyimpanan ke-0 dan ke-1 memperlihatkan perbedaan yang tidak nyata. (P>0,05) antara perlakuan. Akan tetapi, sesudah penyimpanan pada hari ke-2 sampai ke-7 menyatakan perbedaan yang nyata antara perlakuan (P<0,05). Spermatozoa sapi Angus yang dipreservasi pada pengencer T-KT dapat mempertahankan motilitas spermatozoa semasa penyimpanan.

Pada penyimpanan hari ke-0, hasil analisis statistik terhadap motilitas spermatozoa menyatakan perbedaan yang tidak nyata. (P>0,05) antara perlakuan. Akan tetapi

sesudah dipreservasi selama lima hari, spermatozoa yang dipreservasi pada perlakuan P2 menghasilkan motilitas yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) daripada P0, P3, dan P4 serta berbeda tidak nyata ( $P > 0,05$ ) dengan perlakuan P1. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan Zn dengan level 20 mg per mL T-KT dapat menunjang daya hidup dan motilitas spermatozoa sapi Angus yang lebih baik daripada level Zn lainnya. Hal ini semakin menegaskan peranan zinc sebagai antioksidan yang dapat menetralkan pengaruh negatif yang ditimbulkan oleh radikal bebas yang diproduksi secara berlebihan selama preservasi sperma.

Antioksidan berfungsi sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid, dengan cara mencegah terjadinya autoksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid (Shui *et al.*, 2004). Egwurugwu *et al.* (2013) menyatakan bahwa pemberian Zn dapat mempertahankan motilitas sperma. Zn terlibat dalam katabolisme lipid yang merupakan sumber energi utama yang dibutuhkan untuk pergerakan spermatozoa. Zink dapat melindungi sperma dari radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan membran dan menghambat fosfolipase pada peroksidase lipid (Payaran *et al.*, 2014).

Hasil penelitian ini tidak sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Payaran *et*

*al.* (2014) menyatakan bahwa semakin besar takaran zink yang diberikan, maka semakin besar pengaruh peningkatan kualitas spermatozoa. Namun apabila dibandingkan dengan hasil penelitian yang dilakukan saat ini, hasil terbaik yang diperoleh adalah pada level Zn 20 mg (P2) dan terendah pada level Zn 40 mg (P4).

Standar motilitas minimum yang layak untuk digunakan pada inseminasi buatan adalah 40% yang terdapat pada setiap perlakuan yang diamati pada hari yang berbeda. Berdasarkan Tabel 3 maka untuk keperluan inseminasi buatan, spermatozoa yang dipreservasi pada perlakuan P0, P1, dan P3 hanya dapat disimpan selama empat hari, perlakuan P4 hanya tiga hari, dan perlakuan P2 lima hari.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa

Pemeriksaan viabilitas spermatozoa merupakan hal yang penting dalam penilaian kualitas spermatozoa. Nilai viabilitas spermatozoa, semakin tinggi persentasenya maka semakin bagus pula kualitas semennya. Persentase viabilitas spermatozoa sapi Angus hasil penelitian ditampilkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Viabilitas spermatozoa sapi Angus pasca preservasi pada pengencer T-KT dengan beberapa level zink

Hari ke-	Perlakuan					p-value
	P0	P1.	P2.	P3.	P4.	
0	85,64±1,56 <sup>a</sup>	85,22±2,36 <sup>a</sup>	85,56±1,79 <sup>a</sup>	86,17±1,34 <sup>a</sup>	85,42±1,50 <sup>a</sup>	0.932
1	79,17±2,48 <sup>b</sup>	81,24±2,85 <sup>b</sup>	78,82±3,54 <sup>b</sup>	76,09±4,83 <sup>ab</sup>	73,36±3,93 <sup>a</sup>	0.034
2	70,17±3,77 <sup>ab</sup>	73,15±6,09 <sup>b</sup>	73,66±4,23 <sup>b</sup>	70,03±4,62 <sup>ab</sup>	64,99±6,04 <sup>a</sup>	0.090
3	63,99±3,62 <sup>ab</sup>	64,16±7,70 <sup>ab</sup>	66,83±6,86 <sup>b</sup>	61,50±8,10 <sup>ab</sup>	55,27±6,70 <sup>a</sup>	0.119
4	53,59±2,97 <sup>a</sup>	55,82±9,92 <sup>a</sup>	52,12±8,63 <sup>a</sup>	48,25±5,53 <sup>a</sup>	48,25±5,53 <sup>a</sup>	0.444
5	42,17±6,93 <sup>a</sup>	48,41±10,33 <sup>a</sup>	48,39±13,59 <sup>a</sup>	43,68±8,78 <sup>a</sup>	41,34±4,87 <sup>a</sup>	0.631
6	31,99±6,90 <sup>a</sup>	38,94±13,07 <sup>a</sup>	41,55±15,34 <sup>a</sup>	33,22±9,78 <sup>a</sup>	30,19±4,19 <sup>a</sup>	0.416
7	24,63±6,86 <sup>a</sup>	32,66±12,95 <sup>a</sup>	34,39±11,09 <sup>a</sup>	26,18±9,34 <sup>a</sup>	21,40±4,94 <sup>a</sup>	0.195

<sup>a,b,c,d</sup> Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ )

Dari Tabel 4, dapat dilihat hasil viabilitas spermatozoa mengalami penurunan rata-rata persentase sejalan dengan bertambahnya waktu penyimpanan, namun tingkat penurunan viabilitas spermatozoa berbeda antara perlakuan. Rata-rata penurunan viabilitas spermatozoa pada perlakuan P0 adalah 8,80%, P1:7,50%, P2:7,31%, P3:8,57%, dan P4:9,14%, penurunan tertinggi terjadi pada P4 dan yang terendah pada P2. Menurunnya persentase viabilitas spermatozoa disebabkan oleh keadaan membran

plasma spermatozoa yang sudah rusak. Selain itu penurunan persentase viabilitas dapat pula disebabkan oleh spermatozoa yang telah mati. Hal ini sesuai dengan pernyataan Solihati *et al.* (2006) mengatakan bahwa banyaknya spermatozoa yang mati bisa memengaruhi spermatozoa yang masih hidup selama penyimpanan.

Jika dibandingkan dengan nilai motilitas spermatozoa maka, nilai viabilitas lebih tinggi dikarenakan nilai viabilitas merupakan

penjumlahan dari spermatozoa yang bergerak maju (progresif), yang bergerak kurang progresif, dan yang tidak bergerak namun masih hidup, sedangkan motilitas sperma hanya diperoleh dari spermatozoa yang bergerak maju kedepan secara progresif. Kecepatan penurunan nilai viabilitas pada setiap perlakuan selama pengamatan berbeda, faktor yang menyebabkan perbedaan tersebut adalah tingkat stress pada saat pengenceran dan selama penyimpanan (Yani dan Nuryadi, 2001). Menurut penjelasan Yani dan Nuryadi (2001), penurunan viabilitas spermatozoa diakibatkan karena dengan cara yang alamiah akan mengalami kematian sel, spermatozoa yang stress pada saat pengenceran serta mengalami penurunan kualitas sehingga jumlah spermatozoa yang mati akan meningkat pasca penyimpanan hari ke-dua dilanjutkan hari ke-tiga.

Pada penyimpanan dari hari ke-1 hingga hari ke-7 menunjukkan hasil analisis statistik dari viabilitas spermatozoa, penyimpanan menunjukkan penambahan zink didalam pengencer T-KT memberi pengaruh yang tidak nyata..( $P>0,05$ ), bahkan pada hari pertama penyimpanan, P4 dengan level zink 40 mg menghasilkan viabilitas spermatozoa yang lebih rendah ( $P<0,05$ ) dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa dengan adanya penambahan zink didalam pengencer T-KT

tidak berdampak positif terhadap viabilitas spermatozoa dan hasil ini berbeda dengan dampak yang ditimbulkan motilitas spermatozoa yang bersifat positif. Hal ini, semakin memperjelas peranan zink terhadap motilitas spermatozoa melalui peranannya dalam meningkatkan kerja enzim baik berkaitan dengan produksi energi yang berasal dari adenosine triphosphate (ATP) yang siap digunakan untuk motilitas spermatozoa maupun melalui kerjanya sebagai antioksidan intraseluler untuk menghambat atau menetralkan radikal bebas..Hal ini sepadan dengan pernyataan Solihati *et al.* (2006), bahwa Zn memiliki peran sebagai antioksidan yang bisa menjaga sperma dari radikal bebas yang dapat menghambat fosfolifase pada peroksidase lipid serta mampu mengakibatkan kerusakan pada membran.

### Pengaruh Perlakuan terhadap abnormalitas Spermatozoa

Afiati *et al.* (2015) menyatakan abnormalitas adalah salah satu indikator dalam penentuan terhadap kualitas spermatozoa, dikarenakan struktur sel yang tidak normal bisa mengakibatkan gangguan serta hambatan saat pembuahan. Rerataan persentase abnormalitas spermatozoa pada setiap perlakuan bisa dilihat dalam Tabel 5.

Tabel 5. Abnormalitas spermatozoa sapi Angus pasca preservasi didalam pengencer T-KT dengan beberapa level zink

Hari ke-	Perlakuan					p-value
	PO	P1	P2	P3	P4	
0	5,72±2,10 <sup>a</sup>	5,96±2,02 <sup>a</sup>	5,99±1,99 <sup>a</sup>	5,92±1,10 <sup>a</sup>	5,82±2,07 <sup>a</sup>	1.000
1	5,84±2,07 <sup>a</sup>	6,10±2,04 <sup>a</sup>	6,08±2,01 <sup>a</sup>	6,19±1,91 <sup>a</sup>	5,91±2,10 <sup>a</sup>	0.999
2	5,90±2,02 <sup>a</sup>	6,14±1,98 <sup>a</sup>	6,23±1,92 <sup>a</sup>	6,36±1,91 <sup>a</sup>	6,13±2,05 <sup>a</sup>	0.997
3	6,16±1,92 <sup>a</sup>	6,47±1,62 <sup>a</sup>	6,43±1,89 <sup>a</sup>	6,42±1,86 <sup>a</sup>	6,40±2,03 <sup>a</sup>	0.999
4	6,44±1,97 <sup>a</sup>	6,53±2,01 <sup>a</sup>	6,63±1,88 <sup>a</sup>	6,94±1,78 <sup>a</sup>	6,68±1,93 <sup>a</sup>	0.995
5	6,71±1,92 <sup>a</sup>	6,79±1,93 <sup>a</sup>	6,91±1,85 <sup>a</sup>	7,29±1,49 <sup>a</sup>	6,70±1,77 <sup>a</sup>	0.984
6	6,91±1,77 <sup>a</sup>	7,02±1,80 <sup>a</sup>	7,44±1,67 <sup>a</sup>	7,53±1,37 <sup>a</sup>	7,02±1,84 <sup>a</sup>	0.967
7	7,29±1,52 <sup>a</sup>	7,27±1,55 <sup>a</sup>	7,50±1,60 <sup>a</sup>	7,71±1,27 <sup>a</sup>	7,18±1,81 <sup>a</sup>	0.982

<sup>a,b,c,d</sup> Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata. ( $P<0,05$ )

Berdasarkan Tabel 5, bisa dilihat nilai abnormalitas spermatozoa selama preservasi mengalami peningkatan dengan persentase abnormalitas yang berbeda-beda. Namun analisis menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P>0,05$ ), dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-7 penyimpanan. Persentase abnormalitas spermatozoa yang meningkat pada setiap pengamatan dapat dipengaruhi oleh perlakuan pada saat pencampuran semen (Bunga *et al.*,

2014). Peningkatan persentase abnormalitas juga masih pada kisaran yang normal serta bisa dipakai dalam melakukan inseminasi buatan. Hal ini berdasarkan pada penjelasan Johnson *et al.* (2000) yaitu persentase abnormalitas tidak boleh melebihi 20%. Persentase abnormalitas spermatozoa 8-10% tidak dapat memberi dampak yang cukup terhadap pembuahan, namun apabila persentase abnormalitas melebihi

25% akan mengakibatkan terjadinya penurunan terhadap fertilitas.

Perbedaan ini dapat dipengaruhi oleh faktor kesuburan serta umur pejantan (Garner dan Hafez, 2016). Hal ini juga dapat dipengaruhi oleh kerusakan membran plasma yang terjadi akibat *cold shock* (kejutan dingin) serta mengalami perubahan tekanan osmotik dan perubahan tekanan osmotik yang menyebabkan tidak adanya perubahan secara tidak biasa akan bentuk morfologi spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa yang diamati dalam penelitian ini adalah jenis abnormalitas yang sekunder seperti ekor putus, kepala yang terpisah dari ekor dan ekor melengkung.

Adanya peningkatan abnormalitas seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan mungkin berkaitan dengan penurunan lipoprotein yang berada didalam kuning telur yang akan semakin menurun atau berkurang sehingga fungsi perlindungannya terhadap spermatozoa juga mengalami penurunan.

Tabel 6. Pengaruh perlakuan terhadap daya tahan hidup spermatozoa

Perlakuan.(mg)	Daya Tahan Hidup (hari)
P0	4,20±0,45 <sup>ab</sup>
P1	4,80±0,84 <sup>bc</sup>
P2	5,60±0,89 <sup>c</sup>
P3	4,40±0,55 <sup>ab</sup>
P4	3,40±0,89 <sup>a</sup>
p-value	0.003

<sup>a,b,c,d</sup> Superskrip.yang berbeda pada baris yang sama.menunjukkan perbedaan yang.nyata (P<0,05)

Dapat dilihat pada Tabel 6, yakni spermatozoa yang dipreservasi pada perlakuan P2 mempunyai daya tahan hidup yang lebih lama jika dibandingkan dengan kontrol.Hasil analisis statistik yang diperoleh menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh.nyata (P<0,05) terhadap daya.tahan hidup.spermatozoa. Pengencer yang digunakan yaitu pengencer TKT yang memiliki kandungan komposisi bahan yang berfungsi mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa, khususnya lipoprotein, lesitin dan fruktosa serta Zn yang ditambahkan dengan level yang berbeda pada setiap perlakuan, yang semakin memperkuat pertahanan daya tahan spermatozoa dari kerusakan seperti radikal bebas. Zink memiliki sifat antioksidatif dan dapat mengurangi oksigen reaktif yang diproduksi oleh spermatozoa yang rusak serta leukosit dan untuk meningkatkan fertilitas.

Dari hasil pengamatan yang dilaksanakan selama penelitian, bisa diketahui bahwa dari

Peningkatan persentase pada abnormalitas spermatozoa selain disebabkan pada saat dibuatnya preparat atau dapat pula disebabkan oleh adanya peroksidasi lipid (Romadhoni *et al.*, 2014). Apabila waktu penyimpanan semakin lama maka semakin tinggi persentase abnormalitas spermatozoa, hal ini diakibatkan oleh adanya spermatozoa dingin serta ketidakseimbangan tekanan osmotik yang diakibatkan oleh proses metabolik yang berjalan selama penyimpanan secara terus-menerus (Yani dan Nuryadi, 2001).

### Pengaruh Perlakuan terhadap daya tahan hidup Spermatozoa

Daya tahan.hidup merupakan kemampuan spermatozoa untuk selalu hidup dalam masa waktu tertentu pasca penyimpanan *in vitro* (Hine *et al.*, 2014). Rataan daya tahan hidup spermatozoa sapi Angus hasil penelitian disajikan dalam Tabel 6.

masing-masing perlakuan menunjukkan hasil persentase daya tahan hidup spermatozoa yang tidak sama setelah pengenceran. Hasil pengamatan pada P0, P1, dan P3 yaitu daya tahan hidup diatas 50% dan bertahan sampai hari ketiga. Pada P2 daya tahan hidup diatas 50% bertahan sampai hari keempat dan P4 bertahan sampai hari kedua. Hal ini dapat disebabkan karena semakin tinggi kadar zinc di dalam pengencer dapat merubah sifat pengencer menjadi hipertonis. Pengencer yang hipertonis akan menyebabkan pergerakan air dari dalam sel ke luar sel untuk menjaga keseimbangan cairan antara intraseluler dan ekstraseluler, dan pada tingkat tertentu dapat menyebabkan kekurangan cairan di dalam sel yang selanjutnya berdampak pada penurunan motilitas maupun daya tahan hidup sperma (Aisen *et al.*, 2005).

Rendahnya persentase daya tahan hidup dapat disebabkan oleh adanya aktifitas metabolisme spermatozoa.yang membentuk asam laktat pada zat pengencer (Rhoyan *et al.*,

2014). Menurut pernyataan Widjaya (2011), asam laktat yang berlebihan pada pengencer dapat menyebabkan perubahan pH yang dapat

menimbulkan efek racun dan kematian yang tinggi bagi spermatozoa.

## SIMPULAN

Disimpulkan bahwa penambahan level zink pada pengencer tris-kuning telur mampu menghasilkan semen cair sapi Angus yang

berkualitas tinggi, dengan level zink terbaik adalah 20 mg.

## SARAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk menguji keberhasilan pada proses inseminasi

buatan (IB) dengan menggunakan semen yang diencerkan dengan Tris-kuning telur yang ditambahkan zink 20 mg per 100 mL pengencer.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afiati F, Yulnawati MR, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indonesia* 1(4): 930-934. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010449>
- Arifiantini RI, Aun M, Sukmawati E. 2020. Kualitas semen segar dan produksi semen beku sapi pejantan madura pada musim yang berbeda. *Jurnal Ilmu Produksi Dan Teknologi Hasil Peternakan* 8(1): 15–21. <https://doi.org/10.29244/jipthp.8.1.15-21>
- Aisen E, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50:239–249.
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD. 2008. Semen Evaluation In Reproduction In Farm Animal 7th edition ed. by ESE Hafez and B Hafez. pp. 363–375. Blackwell Publisher. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch25>
- Barszcz K, Wiesetek D, Wasowicz M, Kupczynska M. 2012. Bull semen collection and analysis for artificial insemination. *Journal of Agricultural Science* 4 (3): 1-10.
- Binuni R, Maarisit W, Hariyadi H, Saroinsong Y. 2020. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba* dari Kecamatan Tagulandang, Sulawesi Utara menggunakan metode DPPH. *Biofarmasetikal Tropis* 3(1): 79–85.
- <https://doi.org/10.55724/j.biofar.trop.v3i1.260>
- 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. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v7i2.2997>
- Bunga VD, Susilawati T, Wahjuningsih S. 2014. Kualitas semen Sapi Limousin pada pengencer yang berbeda selama pendinginan. *Journal of Tropical Animal Production* 1 (1): 13–20.
- Egwurugwu JN, Ifedi CU, Uchefuna RC, Ezeokafor EN, Alagwu EA. 2013. Effects of zinc on male sex hormones and semen quality in rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences* 28(1): 17–22.
- Fafo M, Hine TM, Nalley WM. 2016. Pengujian efektivitas ekstrak daun kelor dalam pengencer sitrat-kuning telur terhadap kualitas semen cair babi landrace. *Jurnal Nukleus Peternakan* 3(2): 184–195. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v3i2.805>
- Foeh NDFK, Gaina CD. 2017. Sari Buah Lontar Sebagai Pengencer Alami Dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Babi. *Jurnal Kajian Veteriner* 5(1): 52–58. <https://doi.org/10.35508/jkv.v5i1.1024>
- Garner DL, Hafez ESE. 2016. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger*. Philadelphia, 144–164.

- <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>  
Hindrawati S, Ciptadi G, Chuzaemi S. 2020. Kajian Suplementasi Zinc Organik Terhadap Kualitas Semen Pejantan Sapi Bos indicus. *Journal of Tropical Animal Production* 21(2): 237-245. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2020.021.02.7>
- Hine TM, Burhanuddin MA. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. *Jurnal Veteriner* 15(2): 263–273.
- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62(1–3): 143–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Kusumawati ED, Betu H, Krisnaningsih ATN, Rahadi S. 2018. Kualitas Semen Segar Sapi Limousin Pada Lama Simpan yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia* 3 (1): 1–9. <https://doi.org/10.32503/fillia.v3i1.162>
- Nurcholis ARI, Yamin M. 2016. Kriopreservasi semen domba garut menggunakan tris kuning telur yang disuplementasi omega-3 minyak ikan salmon. *Jurnal Veteriner* 17(2): 309–315. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.309>
- Payaran KO, Wantouw B, Tendean L. 2014. Pengaruh pemberian zink terhadap kualitas spermatozoa pada mencit jantan (*Mus musculus*). *E-Biomedik* 2(2): 496–500. <https://doi.org/10.35790/ebm.v2i2.5044>
- Permatasari WD, Setiatin ET, Samsudewa D. 2013. Studi tentang pengencer kuning telur dan pengaruhnya terhadap kualitas semen beku sapi jawa brebes. *Animal Agriculture Journal* 2(1): 143–151. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/aa>
- 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.
- Romadhoni I, Rachmawati A, Suyadi S. 2014. Kualitas semen sapi Madura setelah pengenceran dengan tris aminomethane kuning telur yang disuplementasi  $\alpha$ -tocopherol pada penyimpanan suhu ruang. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 24(1): 39–44.
- Roy B, Baghel RPS, Mohanty TK, Mondal G. 2013. Zinc and male reproduction in domestic animals: A review. *Indian Journal of Animal Nutrition*, 30 (4): 339–350.
- Seuk M. 2018. Pengaruh frekuensi penampungan terhadap kualitas spermatozoa sapi bali. *JAS*. 3(4): 51-53. <https://doi.org/https://doi.org/10.32938/ja.v3i4.540>.
- Siswandoko B, Zaenab S, Husamah H. 2017. Penambahan Ekstrak Kulit Buah Naga Ke Dalam Pengencer Tris Kuning Telur Untuk Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Ettawa. *Scripta Biologica* 4(4): 247–251. DOI: [10.20884/1.sb.2017.4.4.609](https://doi.org/10.20884/1.sb.2017.4.4.609)
- Savitri FK, Suharyati S. 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. DOI: <http://dx.doi.org/10.23960/jipt.v2i3.p%25p>
- Solihati N, Idi R, Setiawan R, Asmara IY. 2006. Pengaruh lama penyimpanan semen cair ayam buras pada suhu 5°C terhadap periode fertil dan fertilitas sperma. *Jurnal Ilmu Ternak* 6 (1): 7–11. DOI: <https://doi.org/10.24198/jit.v6i1.2258>
- Sotler R, Poljšak B, Dahmane R, Jukić T, Jukić DP, Rotim C, Trebše P. 2019. Prooxidant activities of antioxidants and their impact on health. *Acta clinica Croatica* 58(4): 726-736. <https://doi.org/10.20471/acc.2019.58.04.20>
- Susilawati T. 2011. *Spermatologi Malang*. UB Press.
- Suyadi S, Rachmawati A. 2012. Effect of  $\alpha$ -tocopherol in tris-aminomethane-egg yolk on the semen quality during cold storage in boer goats. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 22 (3): 15–26.
- Wawang SK, Nalley WM, Hine TM. 2024. Kualitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer sitrat-kuning telur dengan substitusi sari buah melon (*Cucumis melo* L). *Comserva* 3(11): 4689-4699.
- Widhyari SD, Esfandiari A, Wijaya A, Wulansari R, Widodo S, Maylina L. 2015. Tinjauan penambahan mineral Zn dalam pakan terhadap kualitas spermatozoa pada

- sapi Frisian Holstein jantan. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 20 (1): 72–77.
- Widjaya N. 2011. Pengaruh Pemberian Susu Skim dengan Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi pada Suhu Penyimpanan 5°C. *Sains Peternakan* 9(2) : 72–76.  
<https://doi.org/10.20961/sainspet.v9i2.4796>
- Wiyanti DC, Isnaini N, Trisunuwati P. 2013. Pengaruh lama simpan semen dalam pengencer NaCl fisiologis pada suhu kamar terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung (*Gallus domesticus*). *Journal of Veterinary Sciences* 7(1): 53–55.  
<https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.566>
- Yani A, Nuryadi P. 2001. Pengaruh tingkat substitusi santan kelapa pada pengencer tris kuning telur dan waktu penyimpanan terhadap kualitas semen kambing etawa. *J Biosains* 1(1): 12–15.