

## **PENGARUH PENAMBAHAN ASTAXANTHIN DALAM PENGECER AIR KELAPA MUDA KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR SAPI ANGUS**

*(Effect of adding astaxanthin in egg yolk young coconut water on the quality of liquid semen of angus bull)*

**Mario S. Kurouma, Henderiana L. L. Belli, Johny N. Kihe, Wilmientje M. Nalley**

Program Studi Peternakan, 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: [mario.saturninus11@gmail.com](mailto:mario.saturninus11@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Inseminasi buatan (IB) adalah salah satu teknologi tepat guna yang bisa dimanfaatkan untuk peningkatan produktivitas ternak sapi. Penerapan teknologi IB dapat menggunakan semen beku, semen segar maupun semen cair. Sebagai salah satu faktor mendasar untuk keberhasilan IB kualitas semen dipengaruhi oleh proses pengelolaan semen mulai dari penampungan, pengenceran, hingga preservasi semen. Dilakukannya penelitian guna mengetahui efektivitas pengencer air kelapa muda-kuning telur yang ditambahkan astaxanthin dalam mempertahankan motilitas, viabilitas, abnormalitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi angus. Semen ditampung dari satu ekor sapi angus jantan berusia tiga tahun yang sebelumnya telah dilatih untuk penampungan semen dengan vagina buatan. Semen yang berkualitas baik diencerkan dengan Air kelapa-kuning telur (AK-KT) dengan penambahan astaxanthin (As) pada dosis: 0 (P0), 0,25g (P1), 0,50g (P2), dan 0,75g (P3). Semen disimpan pada suhu 3-5°C setelah diencerkan, dan evaluasi terhadap kualitas spermatozoa dilakukan setiap 24 jam. Perlakuan masing-masing diulang lima kali hingga membentuk 20 unit percobaan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa dalam pengencer AK-KT dengan penambahan As 0,25g (P1) dibandingkan dengan ketiga perlakuan lain memiliki kualitas yang lebih tinggi ( $P < 0,05$ ), yaitu dengan motilitas mencapai ( $35,50 \pm 2,12\%$ ), viabilitas ( $47,41 \pm 3,26\%$ ), abnormalitas ( $6,16 \pm 1,51\%$ ) dan daya tahan hidup (DTH) ( $5,00 \pm 0,00$  hari). Kesimpulan pada penelitian ini adalah penambahan astaxanthin 0,25g dalam pengencer AK-KT efektif mempertahankan kualitas semen cair sapi angus.

**Keywords:** air kelapa, kuning telur, astaxanthin, spermatozoa, sapi angus

### **ABSTRACT**

Artificial insemination (AI) is an appropriate technology that can be used to increase the productivity of cattle. The application of AI technology can use frozen semen, fresh semen or liquid semen. Semen quality as an important factor in the success of AI is influenced by the cement processing process starting from the collection, dilution, and preservation of cement. This study was conducted to determine the effectiveness of young coconut water-egg yolk diluent added with astaxanthin in maintaining motility, viability, abnormalities and survival of Angus cattle spermatozoa. Semen was collected from an angus bull about three years old who had previously been trained to collect semen with an artificial vagina. Semen of good quality is diluted with coconut water-egg yolk (CW-EY) with the addition of astaxanthin (As) at doses: 0 (T0), 0.25g (T1), 0.50g (T2), and 0.75g (T3). Semen was stored at 3-5°C after being diluted, and evaluation of the quality of spermatozoa was carried out every 24 hours. Each treatment was repeated five times to form 20 experimental units. The results showed that spermatozoa in CW-EY diluent with the addition of As 0.25g (T1) compared to the other three treatments had higher quality ( $P < 0.05$ ), namely with motility reaching ( $35.50 \pm 2.12\%$ ), viability ( $47.41 \pm 3.26\%$ ), abnormality ( $6.16 \pm 1.51\%$ ) and survival ( $5.00 \pm 0.00$  days). The conclusion in this study was that the addition of 0.25g of astaxanthin in CW-EY diluent was effective in maintaining the quality of liquid semen of Angus cattle.

**Keywords:** coconut water, egg yolk, astaxanthin, spermatozoa, angus bull

## PENDAHULUAN

Inseminasi buatan (IB) adalah salah satu teknologi tepat guna yang bisa dimanfaatkan untuk peningkatan produktivitas ternak sapi. Penerapan teknologi IB dapat menggunakan semen segar, semen cair maupun semen beku. Selama ini semen beku banyak digunakan untuk IB, tetapi karena ketersediaan akan straw (semen beku) yang minim dan kelanjutan ketersediaan nitrogen cair yang masih bergantung pada pengiriman/pengadaan dari luar wilayah serta harganya yang cukup mahal, maka upaya maksimalitas pelayanan IB seringkali terkendala. Sebab itu, semen cair adalah salah satu solusi dalam implementasi IB bagi usaha meningkatkan produktivitas dan populasi ternak sapi. Namun, untuk mencapai tujuan dari program IB bergantung pada beberapa faktor yakni faktor kesuburan betina, kualitas semen yang baik, dan keterampilan inseminator (Ardhani *et al.*, 2020).

Sebagai salah satu faktor mendasar untuk keberhasilan IB kualitas semen dipengaruhi oleh proses pengelolaan semen mulai dari penampungan, pengenceran, hingga preservasi semen. Kualitas semen mampu dipertahankan apabila ditambahkan pengencer yang di dalamnya terdapat berbagai nutrisi, anti *cold shock*, penyangga, dan beberapa bahan lain yang secara menyeluruh selama berada pada kawasan *in vitro* bisa menunjang kehidupan spermatozoa. Salah satu bahan pengencer semen yang biasa dipakai dalam pengawetan semen sapi ialah air kelapa muda. Air kelapa muda di dalamnya terkandung vitamin, mineral, glukosa, dan protein. Sehingga pada ternak sapi dan kambing air kelapa muda sering digunakan sebagai pengencer semen. Rizal *et al.* (2018) melaporkan bahwa air kelapa muda terkandung karbohidrat dan juga protein asam amino yang ternyata dapat menyediakan kebutuhan fisik dan kimiawi bagi spermatozoa. Namun demikian, untuk melindungi spermatozoa pada temperatur rendah maka air kelapa perlu ditambahkan kuning telur yang memiliki fungsi untuk melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (Wulansari dan Ducha, 2019).

Komponen yang paling umum dimanfaatkan menjadi bahan pengencer ialah kuning telur. Karena kuning telur mengandung air, mineral, lemak, protein, vitamin, karbohidrat dan berbagai bentuk asam amino esensial dengan kuantitas yang lumayan tinggi dan efeknya menguntungkan sebagai pelindung dari

akrosom dan membran plasma terhadap *cold shock* (Harbin *et al.*, 2016). Lesitin dan lipoprotein yang terkandung dalam kuning telur mampu menjaga dan mempertahankan intensitas sel spermatozoa, menstabilkan membran plasma terhadap suhu dingin yang turun secara tiba-tiba (Anwar *et al.*, 2014).

Menggunakan bahan pengencer dan menyimpan semen cair dalam suhu tertentu pada kurun waktu yang lama bisa berpengaruh pada persentase motilitas spermatozoa. Selama masa penyimpanan sperma bisa mengalami kerusakan membran akibat dari *reactive oxygen species* (ROS) atau stress oksidatif. Stres oksidatif adalah penyebab mendasar rusaknya sperma, yang membatasi terjadinya fosforilasi. Fosforilasi oksidatif yang terganggu menyebabkan meningkatnya ROS, taraf ROS yang tinggi didalam sel mampu mengoksidasi DNA, protein, dan lipid. Membran plasma sperma mempunyai fosfolipid pada taraf yang tinggi mengakibatkan spermatozoa sangat rentan terhadap *reactive oxygen species* (Pian *et al.*, 2019). Untuk mengurangi kerusakan sel selama penyimpanan maka perlu ditambahkan antioksidan. Penggunaan antioksidan pada pengencer semen sudah sering dilaporkan, seperti penggunaan astaxanthin mampu melindungi membran plasma sperma. Octa (2014) menjelaskan bahwa diantara astaxanthin dan jenis karoten yang lain, astaxanthin terbukti mempunyai operasi antioksidan sepuluh kali lebih kuat dibandingkan dengan himpunan karoten lain seperti beta karoten. Astaxanthin merupakan pigmen karotenoid golongan xantofil yang dikenal sebagai antioksidan biologis yang baik. Astaxanthin terdapat dalam mikroalga yang hidup di perairan seluruh dunia, serta pada fauna laut seperti udang, lobster, dan salmon segar (Utari, 2016). Astaxanthin merupakan antioksidan paling kuat saat ini, menurut Bagchi *et al.* (1997) astaxanthin memiliki kemampuan dalam memblokir radikal bebas 65 kali lebih besar daripada Vitamin C, 14 kali lebih kuat dari Vitamin E, dan 54 kali lebih kuat dari beta karoten.

Astaxanthin juga adalah salah satu pigmen karotenoid (seperti  $\beta$ -karoten), yang diekstrak dari mikroalga strain *tropic* dan seringkali disebut dengan *haematococcus pluvialis*. Senyawa ini mempunyai gugus radikal yang dapat membuat tubuh terlindung dari proses peroksidasi lemak dan kerusakan yang

diakibatkan oleh proses oksidatif dalam *membrane* sel pada jaringan tubuh (Winarsi, 2007). Somoyani (2012) menyatakan bahwa astaxanthin merupakan antioksidan yang bersifat alami, kuat, serta mempunyai elektron yang mampu menetralkan radikal bebas.

## METHODE PENELITIAN

### Materi penelitian

Penelitian ini menggunakan semen segar dari 1 ekor sapi angus jantan berusia tiga tahun yang sudah terlatih untuk ditampung semennya dan dalam kondisi sehat.

### Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap (RAL), terdiri dari 4 perlakuan dan 5 kali penampungan sebagai ulangan sehingga membentuk 20 satuan percobaan. Keempat perlakuan yang dimaksud ialah: P0: Air kelapa-kuning telur (AK-KT) 100mL+ astaxanthin 0g (As), P1: AK-KT + As 0,25g, P2: AK-KT + As 0,50g, P3: K-KT + As 0,75g

### Penyiapan Bahan Pengencer

Pada tahap persiapan pengencer semen sapi angus, bahan pengencer astaxanthin ditimbang sesuai perlakuan yakni P0 sebanyak 0 gram (sebagai kontrol), P1 0,25 gram, P2 0,50 gram, dan P3 0,75 gram. Dalam penelitian ini ada 3 jenis bahan pengencer yang digunakan yakni bahan pengencer astaxanthin, air kelapa muda dan kuning telur.

Penyiapan bahan pengencer air kelapa muda dengan cara: kulit buah kelapa di kupas menggunakan parang yang steril hingga menemukan isi buah kelapa bagian luar lalu dilubangi. Kemudian dengan menggunakan spuit yang steril, air kelapa muda disedot lalu dimasukkan kedalam gelas ukur dan ditutup menggunakan kertas aluminium foil.

Penyiapan bahan pengencer kuning telur yakni : a). Bersihkan telur menggunakan *alcohol* 70% agar steril dan bersih kemudian pecahkan telur di bagian yang lancip lalu pisahkan putih telur dengan kuning telur dengan cara ditiriskan. b). Kuning telur yang hanya dibungkus selaput vitellin ditaruh pada kertas saring sambil digerakkan supaya sisa-sisa putih telur yang ada terserap. c). Pecahkan kuning telur

Tujuan dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penambahan astaxanthin dalam pengencer air kelapa muda kuning telur terhadap kualitas semen cair sapi angus.

dengan cara jaringan vitellin disobek perlahan-lahan menggunakan ujung pipet lalu tuangkan kuning telur kedalam gelas ukur. d). Kuning telur telah siap untuk dipakai.

Pengencer air kelapa muda-kuning telur ditambahkan astaxanthin sesuai dosis perlakuan lalu dihomogenkan, ditambahkan *penicillin* 1000 IU dan *streptomycin* 1mg/mL, pengencer kemudian dihomogenkan kembali secara perlahan.

### Penampungan Semen dan Evaluasi Semen Segar

Semen ditampung menggunakan metoda vagina buatan. Setelah penampungan semen segar dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. pada evaluasi makroskopis semen segar mencakup warna, konsistensi, volume, dan derajat keasaman semen. Sedangkan, pada evaluasi mikroskopis semen segar mencakup gerakan massa melalui mikroskop pada pembesaran 10×10, konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas sperma melalui mikroskop electron pada pembesaran 40×10.

### Pengenceran dan Penyimpanan Semen

Laos *et al.* (2021) menjelaskan bahwa semen yang akan dipergunakan harus mempunyai motilitas >70%, konsentrasi >800×10<sup>6</sup>, dan abnormalitas <15%. Semen lalu diencerkan menggunakan AK-KT dengan penambahan As dalam berbagai konsentrasi. Setelah pengenceran semen, semen dipreservasi dalam suhu 3–5°C dan dilakukan penghitungan terhadap motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan daya tahan hidup (DTH) sperma setiap 24 jam.

### Variabel Penelitian

Variabel yang diukur pada penelitian ini ialah motilitas sperma (%), viabilitas sperma (%), abnormalitas sperma (%) dan daya tahan hidup sperma (hari).

### Analisis Data

Data hasil penelitian dihitung menggunakan analysis of variance (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Analisis

menggunakan MS office Excell 2019 dan software SPSS 25.0 for windows.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar Sapi Angus

Karakteristik semen segar yang diperoleh dari penelitian ini akan disajikan dalam Tabel 1. Karakteristik semen segar yang

dipakai pada penelitian ini mempunyai kualitas motilitas  $76,00 \pm 2,23$ , viabilitas  $84,62 \pm 2,17$ , abnormalitas  $4,87 \pm 1,10$ .

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi angus

Karakteristik semen	Rerata $\pm$ standar deviasi
Makroskopis	
Warna	Krem
Volume (mL)	$3,30 \pm 0,90$
pH	$6,40 \pm 0,00$
Konsistensi	Sedang
Mikroskopis	
Konsentrasi ( $\times 10^6$ sel/ml)	$1010,00 \pm 88,60$
Gerakan Massa	++ - +++
Motilitas (%)	$76,00 \pm 2,23$
Viabilitas (%)	$84,62 \pm 2,17$
Abnormalitas (%)	$4,87 \pm 1,10$

Warna semen sapi angus yang diperoleh pada penelitian ialah krem dan dikategorikan normal, situasi ini sepeham dengan pernyataan Toelihere (1993) yang menjelaskan kalau sapi normal umumnya memiliki semen berwarna putih susu dan yang memiliki warna krem 10% saja. Dari hasil observasi diperoleh volume rata-rata dari semen sapi angus dan dipakai dalam penelitian ialah  $3,30 \pm 0,90$  mL. Hasil ini tergolong rendah apabila dicocokkan dengan penjelasan Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan jikalau kisaran volume semen sapi pada saat ditampung kurang lebih 5-8 mL.

Semen hasil penelitian konsistensinya tergolong sedang. Suyadi (2012) menyatakan bahwa makin encer semen akan membuat makin sedikit konsentrasi sperma sehingga warna semenpun akan makin pucat yang artinya bahwa warna, konsentrasi dan konsistensi sperma mempunyai keterkaitan yang kuat satu sama lain. Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh yaitu  $1010,00 \pm 88,60 \cdot 10^6$ /mL. Maka perolehan ini selaras dengan hasil kajian Romadhoni *et al.* (2014) yang menjelaskan bahwa konsistensi merupakan derajat kekentalan yang bertaut kuat dengan

konsentrasi sperma, semen sapi yang memiliki konsistensi sedang - kental mempunyai warna krem dan memiliki 1000 hingga 2000 juta sperma/mL konsentrasi.

Observasi terhadap pH (derajat keasaman) semen pada penelitian memperoleh rata-rata  $6,4 \pm 0,00$ . Perolehan ini menunjukkan bahwa derajat keasaman semen yang dipakai dalam penelitian dikategorikan normal. Sesuai dengan pendapat Ax *et al.* (2008) menyatakan bahwa kisaran derajat keasaman (pH) semen sapi mencapai 6,4 hingga 7,8. Gerakan massa semen segar sapi angus hasil penelitian sebesar ++ - +++.

Motilitas sperma sapi angus yang diperoleh  $76,00 \pm 2,23$  %. Hasil yang diperoleh sudah memenuhi syarat untuk dilakukannya pengenceran semen dimana berdasarkan pernyataan Garner dan Hafez (2000) yang mengemukakan jikalau motilitas sperma ternak sapi mencapai kisaran 40–75%, sehingga agar bisa dilakukannya proses pengenceran maka ketentuan minimal motilitas semen segar 70%.

Viabilitas sperma sapi angus yang dipakai dalam penelitian ialah  $84,62 \pm 2,17$ %. Dapat diartikan bahwa pada penelitian ini semen sapi

angus yang dipakai tergolong memenuhi syarat. Ducha *et al.* (2013) menjelaskan bahwa semen dapat diencerkan apabila persentase sperma hidup minimal 70%.

Rataan nilai abnormal sperma yang diperoleh  $4,87 \pm 1,10$  %. Angka ini sesuai pernyataan Garner and Hafez (2000) masih berada dalam kisaran normal dimana abnormal spermatozoa tidak boleh lebih dari 20%.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Motilitas Spermatozoa

Motilitas sperma atau kemampuan sperma untuk bergerak adalah salah satu penentu keberhasilan spermatozoa agar bisa menggapai sel telur dalam saluran tuba fallopi serta metode yang sangat simpel pada evaluasi spermatozoa untuk IB (Garner dan Hafez, 2000). Setelah pengenceran, evaluasi terhadap motilitas spermatozoa adalah parameter yang paling penting untuk dievaluasi sebelum semen digunakan dalam IB.

Rerata nilai motilitas sperma sapi angus dari masing-masing perlakuan bisa diamati dalam Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap motilitas spermatozoa

Hari ke	Perlakuan				P Value
	P0	P1	P2	P3	
0	75,50±1,11 <sup>a</sup>	76,50±2,23 <sup>a</sup>	76,50±2,23 <sup>a</sup>	76,50±2,23 <sup>a</sup>	0,89
1	63,40±4,15 <sup>ab</sup>	71,80±2,48 <sup>c</sup>	64,80±3,56 <sup>b</sup>	59,60±3,64 <sup>a</sup>	0,00
2	52,80±2,16 <sup>b</sup>	66,40±2,19 <sup>c</sup>	56,60±5,94 <sup>b</sup>	43,00±4,47 <sup>a</sup>	0,00
3	40,20±2,86 <sup>b</sup>	60,00±0,00 <sup>d</sup>	48,60±2,19 <sup>c</sup>	30,60±5,63 <sup>a</sup>	0,00
4	30,80±5,35 <sup>b</sup>	50,80±1,78 <sup>d</sup>	40,60±2,60 <sup>c</sup>	22,00±4,47 <sup>a</sup>	0,00
5	21,20±5,01 <sup>b</sup>	41,60±2,30 <sup>d</sup>	30,20±0,44 <sup>c</sup>	12,00±4,47 <sup>a</sup>	0,00
6	12,00±4,47 <sup>a</sup>	35,50±2,12 <sup>b</sup>	20,40±6,18 <sup>c</sup>	5,00±0,00 <sup>d</sup>	0,00

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). P0 = AK-KT100%, P1 = AK-KT+As 0,25g, P2 = AK-KT+As 0,50g, P3 = AK-KT+As 0,75g

Sperma sapi angus pada pengencer AK-KT dengan penambahan As selama penyimpanan, motilitas spermatozoa mampu dipertahankan. Hasil terbaik dalam penelitian ini teramati pada perlakuan AK-KT-As 0,25g (P1) dengan motilitas  $41,60 \pm 2,30\%$  selama 5 hari penyimpanan jika dibandingkan dengan kontrol AK-KT 100% (P0) dengan nilai motilitas  $40,20 \pm 2,86\%$  teramati pada hari ke-3 preservasi, perbedaan ini diduga karena adanya penambahan As yang mengandung antioksidan dan berfungsi sebagai pelindung bagi sperma terhadap peroksidasi lipid karena munculnya oksidan (radikal bebas). Astaxanthin melindungi sperma terhadap peroksidasi lipid dengan cara memblokir reaksi tali peroksidasi lipid dan membuat *membrane* lemak terlindung dari reaksi terhadap O- (singlet oksigen). Disampaikan oleh Indrawati *et al.* (2013) bahwa astaxanthin mempunyai aktivitas antioksidan 10x lebih kuat daripada fraksi beta karoten lainnya.

Perlakuan AK-KT100% terjadi degradasi, selama penyimpanan dan nilai motilitas 40% dicapai pada hari ke-3 menunjukkan bahwa tanpa penambahan As sehingga sperma banyak

yang mati dan menjadi *toxic* bagi sperma lain yang masih bergerak progresif. Rosmaidar *et al.* (2013) mengatakan bahwa degradasi kualitas spermatozoa dalam masa preservasi, tidak terkecuali nilai motilitas bisa terjadi diduga karena akibat dari jumlah sperma yang mati lalu menjadi *toxic* buat spermatozoa lain yang masih bergerak progresif sangat signifikan, sehingga secara harafiah kualitas spermatozoa menurun.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa terjadi penurunan motilitas sperma selama penyimpanan, rentang penurunan motilitas pada setiap perlakuan tidak sama. Hingga hari ke-5 preservasi, perlakuan P1 masih menunjukkan nilai motilitas  $>40\%$ , sementara hingga masa preservasi yang sama perlakuan P0, P2, dan P3 menunjukkan nilai pergerakan progresif  $<40\%$ . Perbedaan ini diduga karena level As yang diberikan melebihi kebutuhan sehingga menjadi *toxic* bagi sperma. Selama masa preservasi persentase pergerakan progresif spermatozoa sapi angus menurun, peristiwa ini diduga terjadi karena selama masa preservasi persediaan energi dalam pengencer semakin menyusut, terjadi reaksi oksidasi selama masa preservasi yang mengakibatkan zat-zat nutrisi dalam pengencer

menjadi *toxic*, bertambahnya radikal bebas menyebabkan kerusakan dalam keutuhan membran plasma sperma, terdapat sperma yang rusak dan mati akibat suhu rendah sehingga menjadi racun terhadap sperma lain serta meningkatnya konsentrasi asam laktat sehingga pH semen meningkat (Kusumawati *et al.*, 2017; Wiyanti *et al.*, 2013).

Hasil analisis statistik pada gerakan progresif spermatozoa setelah diencerkan memperlihatkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ) antar perlakuan. Namun memperlihatkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $P < 0,05$ ) setelah preservasi 1-5 hari. Peristiwa ini dapat diartikan bahwa perlakuan menunjukkan respon positif terhadap spermatozoa sapi angus. Hingga 5 hari masa penyimpanan, perlakuan P0 memperlihatkan nilai motil spermatozoa lebih rendah secara nyata ( $P < 0,05$ ) daripada perlakuan P1, P2, dan P3. Kurangnya nilai gerakan progresif sperma pada perlakuan kontrol diduga timbul akibat pengencer kuning telur dan air kelapa hanya bersifat sebagai *buffer* serta anti *cold shock* dan berfungsi sebagai sumber nutrisi tapi tidak bersifat sebagai antioksidan yang bisa melindungi sperma terhadap radikal bebas. Kuning telur berperan dalam melindungi sperma dari ancaman kejutan dingin dan kuning telur juga selaku penyumbang energi yang dapat menunjang sperma untuk dapat bergerak. Kandungan pokok dalam kuning telur diantaranya terdapat vitamin, air, lemak, protein, mineral, dan karbohidrat, yang tergolong kompleks karena mengandung berbagai asam amino esensial dengan besaran yang lumayan signifikan. selain dari itu, kuning telur juga terkandung lipoprotein sebagai sumber nutrisi bagi keberlangsungan hidup sperma dan terhindar dari terjadinya kejutan dingin (Harbin *et al.*, 2016).

Namun tidak stabilnya *membrane* dan pertukaran dalam konsentrasi susunan matrik lipid bisa berlangsung apabila terdapat kuning telur dalam pengencer, sehingga dapat mengakibatkan terjadinya *hydrolysis* lesitin daripada kuning telur ke isolilesitin kemudian asam.lipid yang dirangsang oleh enzim fosfolipase-A yang disekresikan oleh kelenjar

bulbouretral (Ndeta *et al.*, 2015). Untuk menghambat reaksi peroksida lipid maka perlu ditambahkan antioksidan, yaitu salah.satu zat yang bisa melawan radikal bebas. Astaxanthin merupakan antioksidan yang menggunakan cara scavenge  $O_2$  dalam mengatasi radikal bebas, bereaksi secara spontan.dengan radikal.peroksil (Hussein *et al.*, 2006). Astaxanthin bisa membentengi dan mencegah peroksidasi *membrane* lipid seperti protein, PUFA, pengaruh sinar ultra violet, kerusakan DNA, dan secara esensial melindungi fungsi biologis serta memiliki peran yang vital didalam respon *imune* dan dapat membuat *membrane* sel mitokondria terlindungi dari ancaman radikal bebas (Bebas dan Gorda, 2017).

### **Pengaruh Perlakuan terhadap Viabilitas Spermatozoa**

Persentase viabilitas (daya hidup) spermatozoa adalah salah satu parameter untuk mengukur kualitas spermatozoa. Viabilitas sperma seringkali dinilai berdasarkan pemeriksaan motilitas dan rasio hidup atau mati. Daya hidup sperma sungguh berpengaruh dalam keberhasilan IB juga dalam proses fertilisasi pada organ reproduksi betina. Semakin bertambah nilai viabilitas spermatozoa maka semakin baik pula mutu spermatozoa tersebut. Persentase viabilitas sperma hasil penelitian tersajikan dalam Tabel 3, dari data pada tabel bisa diamati bahwa persentase daya hidup sperma menurun, akan tetapi menurunnya persentase viabilitas pada setiap perlakuan tidak sama.

Dapat dilihat pada tabel.bahwa penurunan viabilitas sperma berlangsung bersamaan dengan lamanya waktu preservasi. Penurunan ini diduga dapat berlangsung karena turunnya nilai motilitas dan daya hidup sperma dipengaruhi oleh lama masa preservasi juga diduga terjadi karena penyimpanan membuat cadangan energi semakin berkurang dan konsentrasi asam laktat meningkat sehingga kondisi medium menjadi asam. Persentase viabilitas spermatozoa sapi angus pasca pengenceran pada P1 sebesar 85,18% lebih tinggi daripada P0 sebesar 84,09%, P2 sebesar 83,31% dan P3 sebesar 84,20%.

Tabel 3. Pengaruh perlakuan pada daya hidup spermatozoa

Hari ke	Perlakuan				P Value
	P0	P1	P2	P3	
0	84,09±2,60 <sup>a</sup>	85,18±3,00 <sup>a</sup>	83,31±3,70 <sup>a</sup>	84,20±2,94 <sup>a</sup>	0,82
1	75,55±3,54 <sup>b</sup>	81,07±2,67 <sup>c</sup>	74,15±1,08 <sup>b</sup>	66,02±1,89 <sup>a</sup>	0,00
2	66,60±4,55 <sup>b</sup>	74,53±4,31 <sup>c</sup>	65,88±3,92 <sup>b</sup>	51,80±4,86 <sup>a</sup>	0,00
3	53,68±2,90 <sup>b</sup>	71,93±1,82 <sup>c</sup>	58,42±2,44 <sup>b</sup>	39,54±6,87 <sup>a</sup>	0,00
4	42,57±5,69 <sup>b</sup>	63,41±3,22 <sup>d</sup>	52,25±3,44 <sup>c</sup>	29,73±6,40 <sup>a</sup>	0,00
5	33,93±7,70 <sup>b</sup>	52,81±4,80 <sup>c</sup>	41,01±3,02 <sup>b</sup>	20,46±4,65 <sup>a</sup>	0,00
6	23,06±4,42 <sup>a</sup>	47,41±3,26 <sup>b</sup>	31,57±6,00 <sup>c</sup>	13,87±3,67 <sup>d</sup>	0,00

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). P0 = AK-KT100%, P1 = AK-KT+As 0,25g, P2 = AK-KT+As 0,50g, P3 = AK-KT+As 0,75g

Persentase daya hidup sperma bisa turun seiring masa waktu preservasi. Epriana *et al.* (2020) mengatakan bahwa rusaknya *membrane* akrosom dan *membrane* plasma karena pengaruh dari *cold shock* menyebabkan turunnya nilai daya hidup sperma. Muhammad *et al.* (2019) menegaskan bahwa persentase yang menentukan kompleksnya *membrane* spermatozoa adalah persentase daya hidup spermatozoa. *Membrane* spermatozoa yang rusak akan berakibat pada metabolisme intraseluler sperma yang terganggu sehingga persentase sperma bisa menurun dan malah spermatozoa bisa mati. Muhammad *et al.* (2016) juga menambahkan jikalau *membrane* adalah bagian paling luar dari sperma yang memiliki fungsi sebagai pelindung terhadap spermatozoa. Oleh karena itu, jika *membrane* rusak/melemah maka akan menyebabkan spermatozoa mati dan fertilisasi hanya akan dapat dilakukan oleh sperma yang mempunyai *membrane* utuh. Kuning telur merupakan krioprotektan ekstraseluler yang mengandung fosfolipid, kolesterol dan fraksi low-density lipoprotein (LDL) yang tinggi yang berfungsi sebagai komponen pelindung spermatozoa selama penyimpanan (Faizal, 2016).

Semen sapi angus dalam pengencer AK-KT As viabilitas atau daya hidup spermatozoa mampu dipertahankan. Hasil terbaik teramati pada perlakuan AK-KT-As 0,25g teramati sebagai hasil terbaik selama 5 hari masa preservasi. Semakin tinggi dosis astaxanthin maka motilitas dan daya hidup semakin rendah. Peristiwa ini disebabkan oleh penggunaan antioksidan yang lebih tinggi bahkan bisa terjadi pro-oksidan. Dapat dilihat bahwa nilai viabilitas yang didapat dalam pengkajian ini, penambahan astaxanthin pada seluruh kelompok perlakuan memperlihatkan bahwa persentase viabilitas dalam perlakuan P1 lebih besar daripada kelompok perlakuan lain lalu diikuti oleh perlakuan P2 kemudian P3. Peristiwa ini

memperlihatkan bahwa jumlah sperma yang hidup masih banyak tetapi tidak dapat bergerak progresif atau hanya bergetar. Nilai daya hidup sperma seringkali 10% lebih besar ketimbang nilai motilitas sperma (Toelihere, 1993).

Hasil pengkajian data pada daya hidup spermatozoa dalam masa preservasi hari pertama hingga hari keenam memperlihatkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $P < 0,05$ ). Peristiwa ini diperkirakan terjadi karena terdapat pengaruh dari antioksidan berupa astaxanthin yang ketersediaannya dalam pengencer sesuai, sehingga daya hidup spermatozoa dapat dipertahankan. Pemberian antioksidan dengan dosis yang sesuai memberikan hasil yang optimal untuk membendung peroksidasi lemak maka caranya adalah reaksi-reaksi oksidasi lipida dalam *membrane* plasma harus diputus dan dicegah, agar mampu meminimalisir rusaknya *membran* plasma semasa metode pengenceran semen berjalan. Astaxanthin memiliki partikel molekul yang amat khas dan dengan adanya oksigen selaku gugus karbonil (C=O) dan gugus hidroksil (OH), atau perpaduan keduanya. Oleh karena itu, kehadiran kedua gugus fungsional tersebut pada rantai poliena (ketokarotenoid) menjadikan anntioksidan berkemampuan sangat baik ada pada astaxanthin (Bebas dan Gorda, 2017). Adanya gugus keton dan hidroksil dalam tiap – tiap cincin ion astaxanthin membuat kekuatan aktivitas antioksidan dan esterifikasi astaxanthin lebih bersifat polar dan lebih tinggi dari antioksidan lain.

Operasi *metabolism* bisa berlangsung lancar karena adanya *Membrane* plasma yang utuh, maka produk energi berbentuk ATP tidak terhalang sehingga motilitas serta viabilitas spermatozoa mampu dipertahankan (Indrawati, 2013).

### Pengaruh Perlakuan terhadap Abnormalitas Spermatozoa

Hasil uji statistik pada persentase abnormalitas spermatozoa memperlihatkan terdapat perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ) semenjak pasca pengenceran sampai hari keenam penyimpanan. Seluruh perlakuan memperlihatkan persentase abnormalitas dibawah 10%. Hal ini membuktikan bahwa pengencer AKKT yang ditambahkan astaxanthin dapat mengurangi peningkatan abnormalitas

yang berlangsung akibat peroksidasi lipid secara serentak. Ax *et al.* (2008) mengatakan bahwa nilai abnormalitas sperma yang telah  $>20\%$  maka pejantan itu diragukan fertilitasnya. Brillianti *et al.* (2021) menambahkan bahwa 1-8,4% merupakan kisaran normal nilai abnormalitas sperma sapi pejantan.

Rata-rata nilai abnormalitas sperma pada masing-masing perlakuan yang diperoleh ditunjukkan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh perlakuan terhadap abnormalitas spermatozoa

Hari ke	Perlakuan (%)				P Value
	P0	P1	P2	P3	
0	5,25±1,30 <sup>a</sup>	5,20±1,34 <sup>a</sup>	5,32±1,20 <sup>a</sup>	4,96±1,92 <sup>a</sup>	0,98
1	5,41±1,28 <sup>a</sup>	5,66±1,10 <sup>a</sup>	5,35±1,29 <sup>a</sup>	5,49±1,47 <sup>a</sup>	0,98
2	5,47±1,35 <sup>a</sup>	5,76±1,13 <sup>a</sup>	5,47±1,46 <sup>a</sup>	5,53±1,65 <sup>a</sup>	0,98
3	5,83±1,08 <sup>a</sup>	5,64±1,39 <sup>a</sup>	5,57±1,62 <sup>a</sup>	5,75±1,57 <sup>a</sup>	0,99
4	6,02±1,07 <sup>a</sup>	5,83±1,36 <sup>a</sup>	6,07±1,24 <sup>a</sup>	6,16±1,28 <sup>a</sup>	0,97
5	5,76±1,95 <sup>a</sup>	5,90±1,55 <sup>a</sup>	6,16±1,60 <sup>a</sup>	6,77±0,74 <sup>a</sup>	0,73
6	6,31±1,48 <sup>a</sup>	6,16±1,51 <sup>a</sup>	6,18±1,95 <sup>a</sup>	6,68±1,49 <sup>a</sup>	0,95

Superskrip yang sama pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ( $P > 0,05$ ). P0 = AK-KT100%, P1 = AK-KT+As 0,25g, P2 = AK-KT+As 0,50g, P3 = AK-KT+As 0,75g

Persentase abnormalitas semenasegar sapi angus yakni 4,87±1,10% lalu setelah dilakukan pengenceran 5,20±1,34 - 6,16±1,51% hal ini terjadi sebab terdapat mekanisme pengenceran dan penyimpanan dalam temperatur 3-5°C. Dugaan terhadap meningkatnya nilai abnormalitas spermatozoa adalah karena adanya pengaruh dari lipoprotein pada kuning telur yang seiring dengan masa waktu preservasi fungsi utama yang semestinya melindungi sperma terhadap *cold shock* kian menurun. Seperti yang disampaikan oleh Romadhoni *et al.* (2014) yang mengatakan bahwa penyebab abnormalitas terjadi karena adanya kejutan dingin dan tidak seimbang tekanan osmotik yang merupakan efek dari operasi metabolik yang selalu berjalan semasa preservasi pada temperatur 3-5°C. Tenggang waktu preservasi pun memengaruhi persentase abnormal spermatozoa, sesuai pernyataan (Kusumawati *et al.*, 2016) nilai abnormalitas sperma akan terus meningkat seiring dengan lama masa preservasi. Selain itu Menurut Saili dan Rahadi (2014) pembuatan preparat yang kurang sesuai juga mampu menyebabkan terjadinya abnormalitas. Abnormalitas spermatozoa selama penelitian merupakan abnormalitas sekunder yang terjadi akibat proses penyimpanan atau disaat

pembuatan preparat untuk menilai abnormalitas spermatozoa.

### Pengaruh Perlakuan terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa

Kesanggupan sperma agar bisa terus bergerak pada masa waktu tertentu sesudah penyimpanan *in vitro* merupakan yang dimaksud dari daya tahan hidup spermatozoa (Hine *et al.*, 2014).

Sperma sapi angus di perlakuan *control* menunjukkan daya tahannya hidup (DTH) tak lebih panjang daripada perlakuan lain yang menggunakan pengencer AKKT dengan penambahan As (Tabel 5). Hasil pengkajian data memperlihatkan bahwa terhadap daya tahan hidup sperma, perlakuan memberi pengaruh nyata ( $P < 0,05$ ). Peristiwa ini menunjukkan bahwa untuk menunjang kehidupan spermatozoa hingga tenggang waktu tertentu maka pengencer semen sangat dibutuhkan. Pada saat sperma tidak tersuplementasi nutrisi serta adanya bahan yang mampu membuat sperma terlindungi dari kejutan dingin seperti pada perlakuan kontrol, menyebabkan spermatozoa mudah mati dikarenakan substrat energi yang habis, karena energi yang dipakai hanya mengunggulkan

nutrisi yang ada dalam pengencer semen dan dalam plasma semen.

Kelompok perlakuan pada pengencer AK-KT dengan penambahan As berfungsi menjaga morfologi spermatozoa agar tetap utuh dan juga dapat menjaga daya tahan hidup sperma hingga kurun waktu yang lebih panjang. Perlakuan AK-KT As 0,25g bisa dipakai untuk inseminasi buatan hingga hari kelima masa preservasi. Sementara, pada perlakuan AK-KT As 0,50g dan AK-KT As 0,75g berturut-turut dapat dipakai hingga hari ketiga dan hari kedua masa

preservasi. Mengacu pada hasil kajian Salim *et al.* (2012) yang mengungkapkan bahwa untuk menunjang terbentuknya fertilisasi maka suatu ejakulasi maupun semen cair yang dipakai wajib mempunyai total sperma motil yang efektif. Peristiwa ini dapat terjadi karena spermatozoa stres pada saat pengenceran, secara alami sel spermatozoa akan mengalami kematian, dan spermatozoa segar kualitasnya turun sehingga banyak spermatozoa yang mati dalam masa preservasi 2-3 hari (Blegur *et al.*, 2020).

Tabel 5. Pengaruh perlakuan terhadap daya tahan hidup spermatozoa

Perlakuan	Daya tahan hidup (hari)
P0	2,80±0.83 <sup>a</sup>
P1	5,00±0.00 <sup>c</sup>
P2	3,80±0.44 <sup>b</sup>
P3	2,20±0.44 <sup>a</sup>
P Value	0,00

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ). P0 = AK-KT100%, P1 = AK-KT+As 0,25g, P2 = AK-KT+As 0,50g, P3 = AK-KT+As 0,75g

Beberapa faktor yang juga bisa mengakibatkan daya tahan hidup spermatozoa menurun ialah kestabilan spermatozoa saat berada dalam media pengencer, sebab metabolisme dan jumlah spermatozoa yang hidup berkaitan lekat. Dimana, apabila konsentrasi spermatozoa hidup tinggi, maka pergerakan akan bertambah dan metabolisme pun akan bertambah. Spermatozoa membutuhkan energi untuk bergerak. Energi yang dibutuhkan lewat aktivitas enzim pada mitokondria yang menggerakkan siklus creb (Siklus Asam Trikarboksilat), perpindahan elektron fosforilasi oksidatif demi terbentuknya energi berupa ATP atau memiliki fungsi mengubah fruktosa menjadi asam laktat. Sebagai hasil dari mitokondria, oksigen radikal mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid yang mampu membuat *membrane* plasma rusak. Salah satu kendala saat mengawetkan sperma sehubungan dengan turunnya daya gerak ialah munculnya peroksidasi lipid yang menyebabkan *membrane*

plasma sperma menjadi rusak. Penggunaan antioksidan pada level yang sesuai dapat optimal dalam pencegahan serta meminimalisir reaksi peroksidasi lipida dari aktivitas radikal bebas dalam *membrane* plasma sperma (Bebas *et al.*, 2016). Untuk menghambat terjadinya peroksidasi lipid maka perlu penambahan antioksidan. Salah satu antioksidan yang bisa dipakai adalah astaxanthin.

Astaxanthin adalah golongan pigmen seperti  $\beta$ -karoten, yang diekstrak dari mikroalga strain *tropic* dan memiliki nama *Haematococcus pluvialis*. *Haematococcus pluvialis* dapat membuat spermatozoa terlindungi dari proses peroksidasi lipida dan rusaknya *membrane* sel pada jaringan tubuh karena mempunyai gugus radikal (Kardi, 2019). Gugus hidroksil dan keto memungkinkan astaxanthin menjadi lebih polar dan mengalami esterifikasi, bahkan aktifitas antioksidannya lebih tinggi daripada karotenoid lain (Aisoi, 2016).

## SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa pengencer air kelapa-kuning telur yang ditambahkan astaxanthin kualitas spermatozoa sapi Angus

mampu dipertahankan, dengan dosis astaxanthin terbaik adalah 0,25gram.

## SARAN

Dari uraian diatas, perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut dalam menguji keberhasilan inseminasi buatan menggunakan

semen yang diencerkan dengan air kelapa-kuning telur yang ditambahkan astaxanthin 0,25gram.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aisoi L. 2016. Karakteristik astaxanthin sebagai antioksidan. *Novae Guinea Jurnal Biologi* 7 (1): 43–51.
- 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.
- Ardhani F, Mufidah H, Samsuriati R, Putra HP. 2020. Efek lama penyimpanan semen beku sapi bali pada pos inseminasi buatan terhadap membran plasma, tudung akrosom utuh, dan DNA spermatozoa. *Jurnal Ilmu Peternakan Terapan* 3(2): 58-66. <https://doi.org/10.25047/jipt.v3i2.1950>
- Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Hafez ND, Bellin M. 2008. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animal. Edited by Hafez, ESE Co. Director. *Reproductive Health Kiawah Island. South Carolina*. 65–70.
- Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Tran MX, Stohs SJ. 1997. Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 95(2): 79–89.
- Bebas W, Gorda W. 2017. Penambahan astaxanthin pada pengencer kuning /telur berbagai jenis unggas dapat memproteksi semen babi. *Jurnal Veteriner* 17 (4): 484-491. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.4.484>
- Bebas W, Buyona GL, Budiasa MK. 2016. Penambahan vitamin e pada pengencer bts terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi Landrace pada penyimpanan 15°C. *Buletin Veteriner Udayana* 8(1): 1–7.
- 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): 30–38. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v7i2.2997>
- Brillianti FF, Srinto P, Sardjito T, Suprayogi TW, Triana IN, Rahardjo D. 2021. Kualitas semen sapi pejantan berdasarkan umur, suhu, dan kelembaban di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga. *Journal of Animal Reproduction* 10(3): 81-89. <https://doi.org/10.20473/ovz.v10i3.2021.81-89>.
- Ducha N, Trinil S, Sri W. 2013. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi limousin selama penyimpanan pada refrigerator dalam pengencer CEP-2 dengan suplementasi kuning telur. *Journal of Veterinary Sciences* 7(1): 6-8. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v7i1.555>
- Epriana AD, Hine TM, Uly K. 2020. Pengaruh penambahan vitamin e dalam pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas spermatozoa babi Duroc *Jurnal Peternakan Lahan Kering* 2(4): 11–18.
- Faizal M. 2016. Pengaruh Penggunaan Kuning Telur Angsa (Cignus Olor) Dan Air Kelapa Muda (Cocos Nucifera) Terhadap Kualitas Sperma Kambing Boer Dengan Waktu Equilibrase Yang Berbeda. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animals*. Pp: 96–109. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>
- Harbin A, Belli HLL, Nalley WM. 2016. Motilitas dan viabilitas spermatozoa babi landrace dalam pengencer sitrat kuning telur dengan penambahan level sari buah yang berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan* 3(2): 77–83.
- Hussein G, Goto H, Oda S, Ushio, Kinzo M, Hiroshi W. 2006. Antihypertensive

- potential and mechanism of action of astaxanthin: iii. antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29(4): 84–88. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.684>
- Indrawati D, Bebas W, Trilaksana I. 2013. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung dengan penambahan astaxanthin pada suhu 3-5 °C. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(4): 45–52.
- Kardi ID. 2019. Pengaruh pemberian astaxanthin terhadap morfologi dan motilitas spermatozoa mencit jantan dewasa (mus musculus) yang diberikan pelatihan fisik berlebih. *Jurnal Sangkareang Mataram* 5(4): 62–66.
- Kusumawati ED, Henny L, Aju TNK, Trinil S, Nurul I, Romzatul W. 2016. Pengaruh suhu dan lama simpan semen segar terhadap motilitas dan abnormalitas spermatozoa kambing Peranakan Etawa (Pe). *Seminar Nasional Hasil Penelitian* 5(1): 409–412.
- Kusumawati ED, Kris NU, Krisnaningsih ATN, Syam R. 2017. Kualitas semen kambing kacang dengan lama simpan yang berbeda pada suhu ruang menggunakan tris aminomethan kuning telur. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis* 4(3): 42-48. <https://doi.org/10.33772/jitro.v4i3.3894>.
- Laos R, Marawali A, Kune P, Belli HLL, Uly K. 2021. Pengaruh penambahan filtrat rosella (hibiscus sabdariffa linn) ke dalam pengencer tris-kuning telur terhadap kualitas spermatozoa Kambing Kacang. *Jurnal Nukleus Peternakan* 8(2): 24–35. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v8i2.4872>
- Matahine T, Burhannudin, Marawali A. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi Bali. *Jurnal Veteriner* 15(2): 263-273.
- Muhammad D, Nurul I, Kuswati K, Aulia P A Y, Aryogi, Muhammad L, Lukman HY, Trinil S. 2019. Pengaruh berbagai formulasi pengencer dasar air kelapa terhadap kualitas semen cair sapi PO (Peranakan Ongole) selama simpan dingin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan* 29(1): 1–8. <https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2019.029.01.01>.
- Muhammad D, Trinil S, Sri W. 2016. Pengaruh penggunaan cep-2 dengan suplementasi kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi fh (frisian holstein) kualitas rendah selama penyimpanan suhu 4-5°C. *Journal of Tropical Animal Production* 17(1): 66–76. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2016.017.01.8>.
- Ndeta A K, Belli HLL, Uly K. 2015. Pengaruh sari wortel dengan level yang berbeda pada pengencer sitrat kuning telur terhadap motilitas, viabilitas, derajat keasaman spermatozoa Babi Landrace. *Jurnal Nukleus Peternakan* 2(2): 17–28.
- Octa D T, Bagus IGN, Bebas W. 2014. Glukosa-astaxanthin meningkatkan motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung yang disimpan pada suhu 3-5 C. *Indonesia Medicus Veterinus* 3(1): 9-19.
- Pian AI, Tophianong TC, Cyntia DG. 2019. Ekstrak etanol daun kelor sebagai antioksidan dalam pengencer semen babi landrace berbasis air buah lontar. *Jurnal Veteriner Nusantara*. 3(2): 68–75.
- Rizal M, Riyadhi M, Irawan B, Wahdi A, Habibah, Herdis. 2018. Daya hidup spermatozoa epididimis sapi persilangan yang dipreservasi dengan air kelapa muda pada suhu 5°C (viability of epididymal spermatozoa crossbreed cattle preserved with coconut water at 5°C). *Jurnal Veteriner* 18(4): 71-80. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.4.571>.
- Romadhoni I, Rachmawati A, Suyadi. 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.
- Rosmaidar D, Triva M L. 2013. Pengaruh penambahan sari buah tomat dalam media pengencer terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing Boer yang disimpan pada suhu 3–5 °C. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 1(1): 7–17.
- Saili T, Syam. 2014. Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing peranakan etawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis* 1(1):

- 79–87.  
<https://doi.org/10.33772/jitro.v1i1.364>
- Salim MA, Trinil S, Sri W. 2012. Pengaruh metode thawing terhadap kualitas semen beku sapi bali, sapi madura dan Sapi PO. *Jurnal Agripet* 12(2): 14–19. <https://doi.org/10.17969/agripet.v12i2.197>
- Somoyani NK. 2012. Astaxanthin oral mempertahankan jumlah sel spermatogenik mencit yang mengalami aktivitas fisik maksimal. *Jurnal Skala Husada* 9(1): 16-21.
- 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.
- Toelihere M R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak Penerbit Angkasa. Bandung. Pp: 52-57.
- Utari N. 2016. Efek astaxanthin terhadap kadar vascular endothelial growth factor plasma pada non proliferative diabetic retinopathy. SimdosUnud.Ac.Id.
- Winarsi H. 2007. Antioksidan Alami & Radikal Bebas. Pustaka Poltekkes Padang.
- 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>
- Wulansari A, Ducha N. 2019. Pengaruh penambahan kuning telur berbagai jenis unggas dalam pengencer dasar air kelapa terhadap motilitas spermatozoa sapi limousin pada penyimpanan suhu 4-5°C. *LenteraBio: Berkala Ilmiah Biologi* 8(3): 273-277.