

Kualitas *Spermatozoa* Dari Semen Beku Sapi Pasundan *Post-Thawing* Dengan Jenis Pengencer Yang Berbeda

The Role Of Companies In Welfare Workforce At Cv Rizki Mandiri Farm

Rita Widaningsih*, Dini Widianngrum, Rachmat Somanjaya

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Majalengka
Jl. K.H. Abdul Halim No. 103 Majalengka, Jawa Barat 45418, Indonesia

*Corresponding author: ritawidaningsih796@gmail.com

ABSTRACT

One of the strategies employed to augment the population of Pasundan cattle is the implementation of an Artificial Insemination (AI) program. The efficacy of the insemination process is significantly contingent upon the quality of the spermatozoa following the thawing of frozen semen. The selection of an appropriate frozen semen diluent can enhance the efficacy of the AI process. The objective of this study was to analyze the impact of egg yolk tris and skim milk diluent on the quality of spermatozoa derived from frozen semen of Pasundan cattle following thawing. Additionally, the study aimed to assess the extent of variation in spermatozoa quality produced after thawing, based on the type of frozen semen diluent utilized. The study was conducted using a completely randomized design (CRD). A total of 30 frozen semen samples of Pasundan cattle were randomly assigned to two treatment groups, with 15 replicates in each group. The two treatments were a frozen semen dilution using egg yolk tris and skim milk. The parameters observed included motility, viability, and intact plasma membrane (IPM) of spermatozoa following the thawing of frozen semen. Moreover, to ascertain the extent of the discrepancy between the two treatments, the data were subjected to a t-test. The findings indicated that the use of yellow tris as a diluent resulted in a higher spermatozoa motility rate ($p < 0.05$) compared to skim milk as a diluent (47.73 ± 0.67 vs. 14.16 ± 1.55). Furthermore, the two types of diluents did not have a significant effect on post-thawing spermatozoa viability ($p > 0.05$). In contrast, the variable of intact plasma membrane (IPM) demonstrated a higher number for the skim milk diluent ($p < 0.05$) than the egg yolk tris (79.71 ± 1.30 vs. 75.59 ± 1.38). The motility of post-thaw spermatozoa is the factor that plays the most pivotal role in the effectiveness of artificial insemination. It can be concluded that egg yolk tris is a superior type of frozen semen diluent for Pasundan cattle, as evidenced by its ability to produce a greater of spermatozoa motility than skim milk diluent.

Keywords: *Egg Yolk, Frozen Semen Diluent, Post-Thawing, Skin Milk*

PENDAHULUAN

Sapi pasundan merupakan Sumber Daya Genetik Ternak (SDGT) lokal Indonesiasudah ditetapkan dalam peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor:1051/Kpts/SR.120/10/2014. Asal usul sapi pasundan berasal dari adaptasi sepuluh generasi antara Bos javanicus atau banteng atau sapi bali dengan sapi jawa, sapi madura dan sapi sumba ongole (Kementan 2014). Sapi pasundan jantan memiliki potensi reproduksiyang baik untuk diproses menjadi semen beku (Baharun, 2015). Pengembangbiakan sapi pasundan saat ini adalah dengan teknik inseminasi buatan (IB) menggunakan semen beku. Semen beku sapi pasundan diproduksi oleh dua balai, yakni Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang dan Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD), Balai Perbibitan dan Pengembangan Inseminasi

Buatan Ternak Sapi Potong (BPPIBT) Ciamis.

Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas tinggi dibutuhkan bahan pengencer semen yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan, maupun pada saat thawing (Aboagla dan Terada, 2004). Pengencer semen diperlukan untuk menambah volume semen, memberi media untuk hidup spermatozoa, memberi perlindungan, tidak bersifat toksik terhadap spermatozoa, mengandung sumber energy, bersifat isotonis, mengandung *buffer* serta melindungi spermatozoa dari pendinginan secara cepat (*cold shock*) menghambat pertumbuhan bakteri (Susilawati 2022). Bahan pengencer semen yang umum digunakan di Indonesia adalah Tris kuningtelur dan susu skim. Tris Bersama asam sitrat berperan sebagai penyangga untuk mempertahankan perubahan pH akibat terbentuknya asam laktat hasil metabolisme spermatozoa serta berperan mempertahankan tekanan osmolaritas dan keseimbangan elektrolit (Siswanto 2006). Kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas dan selubung lipoprotein dari sel spermatozoa (Baharun 2015). Bahan pengencer Tris kuning telur mampu mempertahankan kualitas semen padasapi pasundan sama baiknya dengan pengencer komersial (Baharun *et al.* 2017). Pengencer skim kuning telur adalah pengencer yang dibuat dari campuran susu skim dan kuning telur. Susu skim merupakan susu yang sudah dikurangi kandungan lemaknya. Susu skim merupakan medium yang sangat menguntungkan bagi spermatozoa karena mengandung nutrisi yang penting seperti karbohidrat dan mineral sebagai energi bagi spermatozoa (Lubis *et al.*, 2013). Selain itu, susu skim juga mengandung zat lipoprotein dan lesitin yang berfungsi melindungi sperma dari kejutandian (Widjaya, 2011). Namun, berdasarkan hasil penelitian, pengenceran semen dengan menggunakan susu memiliki beberapa kelemahan. Kelemahan tersebut antara lain spermatozoa tertutupi oleh butir-butir lemak sehingga tidak jelas terlihat dan pergerakannya agak dibatasi (Manafi, 2011). Kondisi tersebut pada akhirnya dapat menurunkan motilitas sperma pasca pencairan, dan berdampak pada tingkat kesuburan (Aires *et al.*, 2003). Selanjutnya, penggunaan susu skim sebagai pengencer semen juga dapat menimbulkan risiko terkontaminasi mikrobiologis (Bousseau *et al.*, 1998) serta kebiasaan penambahan gliserol bersamaan dengan susu skim dalam proses pengenceran semen dapat menurunkan tingkat kelangsungan hidup sperma (Colas, 1975).

Semen beku adalah semen yang berasal dari pejantan terpilih yang diencerkan dan disimpan sesuai dengan prosedur proses produksi (Permentan 2016). Proses produksi semen beku antara lain: penampungan semen, uji kualitas/evaluasi semen, pengenceran semen, pendinginan semen dan pembekuan semen (Susilawati 2022). Pembekuan merupakan proses penurunan suhu secara bertahap sebelum disimpan dalam N₂ cair yang bersuhu kurang lebih -110°C selama 9 menit (Feradis, 2010). Evaluasi keberhasilan semen beku adalah dengan melakukan kualitas semen post *thawing motility* dengan motilitas progresif pada suhu 37°C selama 10 detik (Susilawati, 2022). Evaluasi semen setelah pembekuan (*After thawing*) yaitu dilakukan dengan menguji persentase hidup sperma minimal 40% dengan gerakan individu 3, test water incubator dan evaluasi semen dengan pewarnaan. (Feradis, 2010). Sedaangkan menurut Susilawati (2022) Parameter dari kualitas semen yaitu: Motilitas spermatozoa, Konsentrasi spermatozoa, Viabilitas spermatozoa, abnormalitas spermatozoa, Total sperma motil (TSM).

Studi pendahuluan dalam pengalaman kerja, perbandingan antara jenis pengencer semen sapi Pasundan dalam proses penyimpanan semen beku dan pengujian kualitas spermatozoa *post-thawing* belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang “Pengujian Kualitas Spermatozoa Sapi Pasundan *Post- thawing* dengan Jenis Pengencer Berbeda” sebagai kajian ilmiah untuk meningkatkan keberhasilan tingkat konsepsi dari proses inseminasi buatan (IB).

MATERI DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah semen beku Sapi Pasundan kemasan 0,25 ml/straw yang disimpan di dalam kontainer berisi nitrogen cair (N₂) dengan suhu - 196⁰ C. Straw semen beku sapi pasundan diperoleh dari UPTD BPPIB Ternak Sapi Potong Ciamis hasil produksi dengan menggunakan pengencer tris kuning telur dan susu skim masing-masing sebanyak 15 dosis. Bahan lainnya yaitu air *thawing* bertemperatur 37⁰ C dan Eosin-nigrosin. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah water Bath 37⁰C, gelas ukur berskala 500 ml, thermometer air raksa 100⁰C, mikro tube, mikropipet, tips mikropipet, gunting, tissue, objek glas, cover glas, heating table, Chamber, mikroskop (untuk pemeriksaan motilitas, viabilitas dan Membran Plasma Utuh (MPU)).

Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Penelitian dilakukan secara eksperimental untuk membandingkan kualitas spermatozoa *post-thawing* dari semen beku sapi Pasundan antara yang menggunakan pengencer tris kuning telur dengan susu skim. Jumlah total semen beku sapi pasundan yang digunakan yaitu sebanyak 30 straw yang terdiri atas semen beku sapi pasundan dengan pengencer tris kuning telur dan susu skim masing masing sebanyak 15 straw.

Variable yang Diamati

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah 1) *Motilitas spermatozoa*, yaitu menghitung sel sperma yang mampu bergerak secara progresif dan merupakan faktor penting dalam proses konsepsi alami dan inseminasi buatan, 2) *Viabilitas spermatozoa*, yaitu menghitung sel sperma yang mampu bertahan hidup dan berfungsi secara efektif dan merupakan hal penting untuk keberhasilan pembuahan, 3) Membran Plasma Utuh (MPU), yaitu mengamati dan menghitung sel sperma yang memiliki kondisi membran plasma utuh yang merupakan komponen penting untuk menjaga kelangsungan hidup dan fungsi sel.

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 di Laboratorium Unit Pelaksana Teknis (UPTD) Balai Perbibitan dan Pengembangan Inseminasi Buatan (BPPIB) Ternak Sapi Potong Ciamis Dusun Kidul RT/RW 11/04 Desa/Kecamatan Cijeungjing Kabupaten Ciamis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Sapi Pasundan

Karakteristik semen segar sapi pasundan untuk proses kriopreservasi disajikan pada Tabel 1. Secara makroskopis semen sapi pasundan dengan nama pejantan Sastrawinata memiliki volume sebanyak 7,5 ml, warna putih susu, pH 6,4 dan konsistensi sedang. Menurut Arifiantini (2012) volume semen sapi berkisar antara 2-15 ml, dengan rata-rata volume semen sebanyak 4-8 ml. Jumlah semen segar yang akan di proses tersebut termasuk ke dalam kategori normal. Nilai pH semen pasundan pada penelitian ini masih terbilang normal karena menurut Aboagla and Terada (2004a), pH semen sapi berkisar antara 6.2 – 7.0. selanjutnya, konsistensi semen menggambarkan jumlah spermatozoa yang terkandung di dalam semen tersebut. Semakin kental semen maka kandungan spermatozoa semakin banyak. Berdasarkan karakteristiknya, semen sapi mempunyai konsistensi encer sampai dengan sedang (Arifiantini 2012), sehingga konsistensi semen sapi pasundan masih sesuai dengan karakteristik semen sapi.

Tabel 1. Data Hasil Evaluasi Semen Segar Secara Makroskopis dan Mikroskopis

No	Kode Pejantan	Volume	Warna	pH	Konsistensi	Gerak Massa	Motilitas	Konsentrasi
1	251920	7.5 ml	Putih Susu	6.4	Sedang	++	70.4%	966.10 ⁶

Sumber : hasil penampungan semen segar di UPTD Balai Perbibitan dan Pengembangan Inseminasi Buatan Ternak Sapi Potong Ciamis Provinsi Jawa Barat

Pemeriksaan mikroskopis menunjukkan nilai gerakan massa ++ yang masih dalam kategori normal. Nilai motilitas progresif spermatozoa pada penelitian kali ini adalah sebesar 70,4% yang masih dalam kategori normal sesuai dengan SNI Nomor 4869-1 Tahun 2021 yang mensyaratkan motilitas semen segar minimum sebesar 70%. Menurut Garner dan Hafez (2000) konsentrasi spermatozoa sapi yang normal berkisar antara 800 – 2000 juta sel/ml sehingga semen segar pada penelitian kali ini masih dalam kategori normal yaitu sebanyak 966 juta sel/ml. Berdasarkan data tersebut, maka semen segar sapi Pasundan dalam penelitian ini dapat digunakan untuk pelaksanaan proses kriopreservasi.

Motilitas Spermatozoa Sapi Pasundan Sebelum Pembekuan pada Dua Jenis Pengencer yang Berbeda

Motilitas spermatozoa sapi pasundan sebelum pembekuan ditunjukkan pada Tabel 2. Data menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa sapi pasundan sebelum pembekuan lebih tinggi ($p < 0,05$) pada pengencer tris kuning telur (TKT) dibandingkan dengan susu skim.

Tabel 2. Motilitas spermatozoa sebelum pembekuan

No	Motilitas spermatozoa sebelum pembekuan (%)	
	Tris Kuning Telur (TKT)	Susu skim
1	70.7 %	30.8%

Hal tersebut terjadi diduga akibat pengencer TKT memiliki bahan penyangga dan kandungan nutrisi yang lebih baik sesuai dengan yang diperlukan oleh sel-sel spermatozoa. Komposisi bahan penyangga dalam pengencer TKT adalah *tris amino methane*. Bahan penyangga berfungsi mempertahankan pH pada bahan pengencer, sedangkan fruktosa berfungsi sebagai sumber nutrisi spermatozoa.

Kuning telur mempunyai komposisi berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Kuning telur umumnya ditambahkan ke dalam bahan pengencer sebagai agen krioprotektan. Pada pengencer susu skim terdapat perbedaan yang cukup jauh pada motilitas. Menurut Suharyati, *et al* (2011), rendahnya persentase motilitas disebabkan kandungan laktosa tinggi yang dapat mempercepat metabolisme spermatozoa selanjutnya terjadi penumpukan asam laktat yang akan menjadi racun bagi spermatozoa akibatnya banyak spermatozoa mati. Salisbury dan Van demark (1985) mengemukakan bahwa kecepatan gerak spermatozoa, umur spermatozoa dan tingkat viskositas media pengencer berpengaruh terhadap motilitas. Pengencer susu skim memiliki tingkat

viskositas tinggi karena kandungan lemak yang tinggi, sehingga persentase motilitas yang dihasilkan yang dihasilkan pada pengencer susu skim lebih rendah.

Kualitas Spermatozoa *Post-thawing* dari Semen Beku Sapi Pasundan pada Dua Jenis Pengencer yang Berbeda

Proses kriopreservasi spermatozoa adalah bioteknologi yang bertujuan untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa dalam jangka waktu lama, sehingga dapat memastikan ketersediaan spermatozoa terus menerus dan dapat dimanfaatkan bila diperlukan (Carolsfeld *et al* 2003; Bakhach, 2009). Keberhasilan kriopreservasi semen pada sapi dipengaruhi oleh berbagai faktor salah satunya adalah jenis pengencer yang digunakan.

Dua pengencer yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Tris Kuning Telur (TKT) dan susu skim. Hal menarik dari fakta yang diperoleh pada penelitian ini yaitu, angka motilitas spermatozoa yang dihasilkan setelah dicairkan dengan pengencer TKT lebih tinggi ($P < 0.05$) dari pengencer susu skim. Sementara itu, untuk variabel viabilitas spermatozoa tidak menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P > 0.05$) baik yang dicairkan dengan bahan pengencer TKT ataupun susu skim. Hal sebaliknya dari angka motilitas, nilai membran plasma utuh (MPU) spermatozoa dari semen beku sapi Pasundan yang menggunakan bahan pengencer TKT lebih rendah ($p < 0.05$) dibanding dengan yang menggunakan bahan pengencer susu skim (Tabel 3).

Tabel 3. Perbandingan Kualitas Spermatozoa Pasca-thawing dengan Jenis Pengencer Berbeda

Variabel	Perlakuan Jenis Pengencer		p-Value
	Tris Kuning Telur	Susu Skim	
Motilitas (%)	47.73±0,67 ^a	14.16±1.55 ^b	0,000
Viabilitas (%)	65.80±0,90	65.35±1,64	0,811
Membran Plasma Utuh (%)	75.59±1.38 ^a	79.71±1.30 ^b	0,038

Keterangan: Superscript berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Adanya perbedaan motilitas spermatozoa antara pengencer TKT dan susu skim diduga akibat teknik pembekuan semen yang digunakan. Menurut Susilawati (2022), teknik pembekuan sangat tergantung pada jenis pengencer yang digunakan, dengan pengencer Tris kuning telur dan susu skim dilakukan secara bertahap dan pemberian gliserol pada suhu 5°C. Namun, dalam penelitian ini, pengenceran dilakukan langsung pada suhu ruang dan penelitian sebelumnya seperti yang dilakukan oleh Fiser dan Fairfull (1989) juga menunjukkan bahwa penambahan gliserol ke dalam pengencer sebelum pembekuan lebih efektif jika dilakukan sekaligus pada suhu rendah (5°C), dari pada secara bertahap.

Kandungan gliserol pada pengencer TKT dan susu skim pada penelitian ini memiliki komposisi yang berbeda, dimana pada pengencer TKT memiliki kandungan gliserol sebanyak 6,5% sedangkan pada susu skim mengandung gliserol sebanyak 8%. Walaupun gliserol dapat memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa, namun dapat juga merusak struktur spermatozoa selama proses pembekuan semen, menyebabkan kejutan osmotik, dan menurunkan nilai antibiotika dalam pengencer semen, serta menurunkan volume sel sperma sebanyak setengah dari volume larutan isotonik sesudah pencairan kembali. Oleh karena itu,

kandungan gliserol di dalam pengencer semen bergantung pada metode pendinginan/pembekuan, komposisi pengencer, dan cara penambahan (Ghazali *et al*, 2002). Konsentrasi gliserol yang optimum umumnya adalah 6 sampai 8% untuk pembekuan lambat dalam ampul (Fiser *etal.*, 1981). Sedangkan pada pembekuan cepat, gliserol memberikan daya tahan paling baik pada konsentrasi 3 samapi 4 % Lightfoot dan Salamon 1969 dan Salamon 1970).

Keutuhan membran plasma spermatozoa merupakan indikator penting dari kesehatan dan viabilitas sel sperma. Ketika membran plasma dalam keadaan utuh, spermatozoa dapat menjalankan fungsi fisiologisnya dengan baik, termasuk motilitas dan kemampuan untuk berfusi dengan ovum (Fannessia *et al.*, 2015). Penambahan gliserol ke dalam pengencer adalah esensial untuk pembekuan semen. Penambahan gliserol dalam pengencer berfungsi untuk mencegah masuknya kristal es ke dalam pori-pori membran spermatozoa (Susilawati, 2022). Gliserol akan masuk ke dalam membran plasma dengan jalan menyeimbangkan konsentrasi intra dan ekstraseluler. Akibatnya air yang tadinya keluar dari membran dengan cara eksoosmosis, akan masuk kembali ke dalam membran dan selanjutnya akan menyeimbangkan kandungan air intra dan ekstraseluler sama seperti sebelum ada gliserol. Jadi respons membran plasma setelah dipaparkan dengan gliserol adalah terjadi pengeluaran air dari dalam sel terlebih dahulu, terjadi pengkerutan sel kemudian difusi gliserol ke dalam sel sehingga akhirnya ukuran sel spermatozoa kembali normal. Menurut Robbins *et al.* (1976) penambahan gliserol ke dalam larutan suatu sel akan mengurangi pemaparan sel terhadap larutan yang berkonsentrasi tinggi karena substansi ini tidak terkristalisasi, tetapi lebih dari itu membantu menjaga konsentrasi garam dalam larutan dari tingkat yang membahayakan selama pembekuan.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa membran plasma utuh spermatozoa dengan pengencer TKT sebesar $75.59 \pm 1.38a$ dan susu skim sebesar 79.71 ± 1.30 . Dari data tersebut pengencer antara pengencer tris kuning telur dan susu skim berpengaruh secara signifikan ($p < 0,05$). Dimana pengencer susu skim lebih efektif dibandingkan dengan pengencer tris kuning telur dalam mempertahankan membran plasma utuh. Hal ini dimungkinkan dapat mempengaruhi membran plasma utuh. Peningkatan gliserol 7 atau 7,5 % dapat menyebabkan kerusakan akrosom pada sebagian besar spermatozoa (Jones, 1965 dan Watson dan Martin, 1975). Meskipun gliserol pada susu skim lebih tinggi (8% dibandingkan 6,5% pada TKT), hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa dalam susu skim mempertahankan membran plasma yang lebih baik dibandingkan dengan TKT. Ini mungkin menunjukkan bahwa pada konsentrasi gliserol yang lebih tinggi meskipun ada risiko kerusakan, susu skim mungkin mengandung komponen lain yang membantu melindungi spermatozoa dengan lebih baik daripada TKT.

Selanjutnya, variabel viabilitas spermatozoa dengan pengencer TKT dan susu skim menunjukkan hasil yang hampir sama, masing-masing 65,80% dan 65,35%, dengan perbedaan yang tidak signifikan ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa kedua pengencer tersebut sama-sama efektif dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa. Hal ini diduga akibat komposisi nutrisi yang ada dalam kedua pengencer tersebut yang mampu memenuhi kebutuhan hidup spermatozoa, termasuk penyediaan sumber energi yang penting bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Spermatozoa tidak dapat hidup dalam waktu yang lama kecuali bila ditambahkan berbagai unsur kedalam semen diantaranya yaitu menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi (Feradias, 2010).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa jenis pengencer, komposisi nutrisi yang pengencer dan teknik pembekuan dapat mempengaruhi motilitas dan membran plasma utuh. Namun tidak mempengaruhi viabilitas. Tris kuning telur sebagai pengencer

memberikan perlindungan yang lebih baik terhadap motilitas spermatozoa selama proses pengenceran satu tahap pada suhu ruang. Sedangkan membran plasma utuh spermatozoa lebih baik dengan pengencer susu skim.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan bahwa dalam proses publikasi artikel ini Dini Widianingrum sebagai Editor in Chief dan Rachmat Somanjaya sebagai Reviewer keduanya tidak ada konflik kepentingan pada jurnal ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada semua pihak yang telah turut membantu selama proses penelitian sampai menjadi artikel ilmiah ini, khususnya kepada Dekan dan sivitas akademika Fakultas Pertanian Universitas Majalengka, keluarga tercinta, dan tim sukses penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinata, Y., Noor, R. R., Priyanto, R., Cyrilla, L., & Sudrajad, P. (2023). Morphometric and physical characteristics of Indonesian beef cattle. *Archives Animal Breeding*, 66(2), 153-161. <https://doi.org/10.5194/aab-66-153-2023>
- Agung, P. P., Saputra, F., Zein, S. H. S., Wulandari, A. S., Putra, W. P. B., Said, S., ... & Jakaria, J. (2018). Genetic diversity of Indonesian cattle breeds based on microsatellite markers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0283>
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01369-9)
- Anwar, S., Volkandari, S. D., Wulandari, A. S., Putra, W. P. B., Sophian, E., & Said, S. (2020). Detection of f94l mutation of the mstn gene in four Indonesian local cattle breeds. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 45(1), 7-14. <https://doi.org/10.14710/jitaa.45.1.7-14>
- Arifiantini RI. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. Bogor (ID):IPB Pr.
- Aboagla EM-E, and Terada T. 2004a. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62:1160-1172
- Baharun A. 2015. Potensi reproduksi serta keberhasilan pembekuan semen menggunakan pengencer tris kuning telur dan tris soya pada pejantan sapi pasundan [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Baharun A, Arifiantini RI, Yusuf TL. 2017. Freezing capability of pasundan bull sperm using tris-egg yolk tris-soy and andromed diluents. *J Ked Hewan*. 11(1):45-49.
- Bousseau, S., Brillard, J. P., Marquant-Le Guienne, B., Guérin, B., Camus, A., & Lechat, M. (1998). Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*, 50(5). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00175-7)
- Braun, J., Hochi, S., Oguri, N., Sato, K., & Torres-Boggino, F. (1995). Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Cryobiology*, 32(5). <https://doi.org/10.1006/cryo.1995.1048>

- Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 42(2). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0420277>
- Cunningham, J.G., Klein, B.G. 2007. *Textbook of Veterinary Physiology*. Saunders Elsevier. China.
- Darusalam.I. 2019. Suplementasi L-Carnitine Dalam Pengencer Berbasis Tris Untuk Meningkatkan Kualitas Semen Beku Sapi Pasundan. [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- De Jonge, C.J., dan C.L.R. Barrat. 2006. *The Sperm Cell : Production, Maturation, Regeneration*. Cambridge University Press. New York. United States.
- Dwitresnadi R, Sulaeman M, Arifin J. 2015. Kinerja usaha pembibitan sapi potong pasundan pada pemeliharaan sistem ekstensif. *J Fapet UNPAD*.4(3):1-11.
- Fannessia, L. D., Karja, N. W. K., Adnyane, I. K. M., & Setiadi, M. A. (2015). "pelacakan kerusakan akrosom spermatozoa domba selama proses pembekuan dengan teknik histokimia lektin (detection of acrosomal damage of ram spermatozoa during freezing process using lectin histochemical technique)". *Jurnal Veteriner*, 16(4), 560-568. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2015.16.4.560>
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi Ternak*. Alfabeta. Bandung.
- Firmiaty, S., Basri, M., & Idrus, M. (2022). Angka kebuntingan sapi bali yang diinseminasi menggunakan semen beku plus sari kopi. *Jurnal Ilmiah Ecosystem*, 22(3), 440-447. <https://doi.org/10.35965/eco.v22i3.1847>
- Foulkes, J. A. (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 49(2). <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0490277>
- Garner, D. L., Thomas, C. A., Gravance, C. G., Marshall, C. E., DeJarnette, J. M., & Allen, C. H. (2001). Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*, 56(1). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00540-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00540-4)
- Hafez, E.S.E. 2000. *Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals*. 7th edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA
- Hardyastuti D M, Sumaryadi M Y, Saleh D M, Setyaningrum A, dan Susanto A. (2023). Kualitas semen cair dan semen beku kambing peranakan etawa (pe) pada berbagai jenis pengencer. *Prosiding Seminar Nasional Pembangunan Dan Pendidikan Vokasi Pertanian*, 4(1), 388-396. <https://doi.org/10.47687/snppvp.v4i1.661>
- Harissatria, H., Hendri, J., Elinda, F., Jaswandi, J., Hendri, H., Zumarni, Z., ... & Afrini, D. (2023). Kualitas semen beku sapi simmental, limousin dan frisian holstein dengan metode thawing yang berbeda. *Jurnal Peternakan*, 20(1), 26. <https://doi.org/10.24014/jupet.v20i1.19563>
- Hartanti D, Setiatin ET, Sutopo. 2012. Perbandingan penggunaan pengencer semen sitrat kuning telur dan tris kuning telur terhadap persentase daya hidup spermatozoa sapi jawa brebes. *Anim Agri J*. 1(1):33-42.
- Indra Kurniawan. 2021 Jan 26. Populasi Sapi Pasundan di Jawa Barat Terus Menurun - PRFM News. *Pikiran Rakyat*., siap terbit. [diakses 2024 Feb 10].<https://prfmnews.pikiran-rakyat.com/jawa-barat/pr-131333762/populasisapi-pasundan-di-jawa-barat-terus-menurun?page=all>.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Weiß, J., Kreienberg, R., Katkov, I., Schulz, M., ... & Sánchez, R. (2008). Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction*, 136(2), 167-173. <https://doi.org/10.1530/rep-07-0463>
- Iskandari, N. N., Madyawati, S. P., Wibawati, P. A., Suprayogi, T. W., Prastiya, R. A., & Agustono, B. (2020). The Difference of Tris Egg Yolk and Skim Milk Egg Yolk

- Diluent on The Percentage of Motility, Viability and Plasma Membrane Integrity of Spermatozoa Sapera Goat on Storage of 5°C Temperature. *Jurnal Medik Veteriner*, 3(2), 196–202.
- Isnaini, N., Harsi, T., Lapoliwa, A. D., Chabiburochman, M. M., & Amarsyah, A. D. (2021). Seasonal variations in semen quality of pasundan bulls in their native tropical environment. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 16(2), 124-129. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2021.124.129>
- Kementerian Pertanian. 2014. Keputusan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 1051 tahun 2014 tentang Penetapan Rumpun Sapi Pasundan. Jakarta (ID): Kementan.
- Kurnia A, Soeparna, Arifiantini RI, Hidayat R. Fertilitas Semen Beku dalam Tris Kuning Telur dan Skim yang Diberi Omega-3 pada Sapi Simmental dengan Ransum Berimbunan Seng dan Selenium Minimal. *Jurnal Veteriner* Vol 19 No. 2 : 251-262
- Kusumawati, E. D., Rahadi, S., Santoso, S., & Yulianti, D. L. (2019). Pengaruh lama thawing yang berbeda pada suhu 25 oc terhadap kualitas semen beku sapi ongole. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis*, 6(1), 119. <https://doi.org/10.33772/jitro.v6i1.6538>
- Lestari, T.P.S, M.Nur Ihsan dan N.Isnaeni (2014). Pengaruh waktu simpan semen segar dengan pengencer andromed Pada suhu ruang terhadap kualitas semen kambing boer Bagian Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. *Jurnal Ternak Tropika* Vol 15.No 1 2014
- Lubis. T.M, Dasrul, C.N.Thasmi, T.Akbar. Efektifitas Penambahan Vitamin C Dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer setelah Penyimpanan Dingin. *Jurnal S. pertanian* 3 (1): 347-361 (2013).
- Mahfud, A., Susilawati, T., Yekti, A. P. A., & Kuswati, K. (2019). Tingkat keberhasilan inseminasi buatan (ib) menggunakan semen beku hasil sexing pada sapi persilangan ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 29(2), 185-192. <https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2019.029.02.10>
- Manafi, M. (2011). Artificial Insemination in Farm Animals. In *Artificial Insemination in Farm Animals*. Malayer University, Iran. <https://doi.org/10.5772/713>
- Manur, F. (2024). Pengaruh substitusi kuning telur bebek dalam pengencer semen life terhadap kualitas spermatozoa babi landrace. *COMSERVA : Jurnal Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, 3(12), 4928-4938. <https://doi.org/10.59141/comserva.v3i12.1278>
- Mardinata, Z. (2013). *Mengolah Data Penelitian Menggunakan Program SAS* (1st ed.). PT. RajaGrafindo Persada.
- Maxwell, W. M. C. (1996). Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 8(8). <https://doi.org/10.1071/RD9961165>
- Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 10/Permentan/Pk.210/3/2016 Tentang Penyediaan Dan Peredaran Semen Beku Ternak Ruminansia.
- Petyim, S., Neungton, C., Thanaboonyawat, I., Laokirkkiat, P., & Choavaratana, R. (2014). Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(12), 1673-1680. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0332-y>
- Pratama, J. W. A., Sari, D. A. K. W., & Sigit, M. (2018). The effect of some thawing methods on the quality of simmental cow frozen cements. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia*, 3(2), 35. <https://doi.org/10.32503/fillia.v3i2.254>
- Puwantara, B., Arifiantini, R. I., Karja, N. W. K., Pardede, B. P., Indriastuti, R., Satrio, F. A., ... & Memili, E. (2022). Pengembangan penanda fertilitas sebagai alat bantu “akurat”

- dalam upaya optimalisasi sapi pejantan unggul dalam program inseminasi buatan. Policy Brief Pertanian, Kelautan Dan Biosains Tropika, 4(1). <https://doi.org/10.29244/agro-maritim.v4.i1.10>
- Rizal, M., Nisa, C., & Norliani, R. (2021). Kualitas semen beku kambing peranakan boer yang dikriopreservasi dengan pengencer tris kuning telur dan berbagai konsentrasi ekstrak daun kelor. Jurnal Veteriner, 22(3), 309-316. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2021.22.3.309>
- Said, S., Putra, W. P. B., Anwar, S., Agung, P. P., & Yuhani, H. (2017). Phenotypic, morphometric characterization and population structure of pasundan cattle at west java, indonesia. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 18(4), 1638-1645. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180443>
- Salim, M.A., T. Susilawati., dan S. Wahyuningsih. 2012. Pengaruh Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet.Vol.12(2):14-19*, Oktober. Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala.Banda Aceh. Indoneasia.
- Salimah, I., Agung, P. P., Said, S., Farajallah, A., & Perwitasari, D. A. (2022). Origin and phylogenetic analysis of pasundan cattle based on d-loop of mitochondrial genome. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 1001(1), 012041. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1001/1/012041>
- Seit. B. 1954. Pembuaian Buatan.Balai Penerbit Indonesia. Jakarta. Suhartodjo. 190.Ilmue Inseminasi Buatan. Edisi Pertama. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya
- Seneda, M. M., Silva-Santos, K. C., & Rafagnin Marinho, L. S. (2016). Biotechnology of animal reproduction. In *Biotechnology of Animal Reproduction*.
- Setiawati E.N, D.M.Saleh dan M.Y Suaryadi. 2018. Kinerja Sapi Pasundan di Jawa Barat. Prosiding Seminar Teknologi dan Agribisnis Peternakan VI: Pengembangan Sumber Daya Genetik Ternak Lokal Menuju Swasembada Pangan Hewani ASUH, Fakultas Peternakan Universitas Jenderal Soedirman.
- Setiawati, E. N., Sumaryadi, M. Y., Saleh, D. M., & Armelia, V. (2022). Reproductive performance and economic estimates of pasundan cattle induced with prostaglandins and hormone releasing gonadotropins. KnE Life Sciences. <https://doi.org/10.18502/kls.v0i0.11837>
- Siswanto. 2006. Kualitas semen di dalam pengencer tris dan natrium sitrat dengan berbagai sumber karbohidrat dan level gliserol pada proses kriopreservasi semen rusa timor (Cervus timorensis) [tesis]. Bogor (ID) : Institut Pertanian Bogor.
- Susiana, S., Kalsum, U., & Sumartono, S. (2021). Pengaruh berbagai konsentrasi gliserol pada pengencer skim kuning telur terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas semen beku sapi limousin. REKASATWA : Jurnal Ilmiah Peternakan, 3(2), 98. <https://doi.org/10.33474/rekasatwa.v3i2.13133>
- Susilawati, T., Isnaini, N., Yekti, A. P. A., Nurjannah, I., Errico, E., & Costa, N. d. (2016). Keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen beku dan semen cair pada sapi peranakan ongole. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan, 26(3), 14-19. <https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2016.026.03.03>
- Susilawati, T., Suyadi, N., Ihsan, S., Wahjuningsih, N., Isnani, A., Rachmawati, A. P. A., Yekti, P., Utami. 2022. Manajemen Reproduksi dan Inseminasi Buatan. UB Pers. Universitas Brawijaya.
- Suyono, S. S., Hinting, A., Lunardhi, H., & I'tishom, R. (2018). Density gradient centrifugation pre-freezing mengoptimalkan persentase morfologi normal spermatozoa pasca-thawing. Majalah Kedokteran Bandung, 50(3), 133-139. <https://doi.org/10.15395/mkb.v50n3.1348>

- Tagama, T.R dan M.Y. Sumaryadi. 2013. *Manajemen Inseminasi Buatan*. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Tarig, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y. M., Baiee, F. H., Khumran, A. M., Salman, H., & Ebrahimi, M. (2017). Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen- thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.024>
- Toelihere, M,R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor: Angkasa. Bandung.
- Toelihere, M,R. 1981. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor: Angkasa. Bandung.
- Üstuner, B., Alcay, S., Nur, Z., Sagirkaya, H., & Soylu, M. K. (2014). Effect of Egg Yolk and Soybean Lecithin on Tris-Based Extender in Post-Thaw Ram Semen Quality and in vitro Fertility. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.10248>
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 62, Issues 1–3). [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6)
- Widyastuti, R., Haq, N. M. D., Pristihadi, D. N., Wahyudin, W., Maheshwari, H., Sumantri, C., ... & Boediono, A. (2022). The viabilities of freeze-thaw pasundan-bull sperms after a short-term exposure to media with different phs. *Tropical Animal Science Journal*, 45(3), 270-276. <https://doi.org/10.5398/tasj.2022.45.3.270>
- Witarsa. 2001. *Evaluasi Semen*. Balai Inseminasi Buatan Lembang. Bandung
- Yekti, A. P. A., Harsah, J., Luthfi, M., Dikman, M., Huda, A. N., Kuswati, .., ... & Susilawati, T. (2018). Kualitas semen dengan berbagai formulasi pengencer dasar air kelapa hijau selama simpan dingin pada sapi madura. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis*, 5(2), 37. <https://doi.org/10.33772/jitro.v5i3.4738>
- Yusuf, T. L., Arifiantini, R. I., Dapawole, R. R., & Nalley, W. M. (2017). Kualitas semen beku babi dalam pengencer komersial yang disuplementasi dengan trehalosa (the quality of boar frozen semen in commercial extender supplemented with trehalose). *Jurnal Veteriner*, 18(1), 69-75. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.1.69>
- Zamuna, K. K., Susilawati, T., Ciptadi, G., & Marjuki, M. (2015). Perbedaan kualitas semen dan produksi semen beku pada berbagai bangsa sapi potong. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*, 16(2), 1-6. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2015.016.02.1>