

**EFFECTS OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL IN EGG YELLOW TRIS AMINOMETHANE BASE DILUENT ON THE QUALITY OF SPERMATOZOA IN MADURA CATTLE FOLLOWING COLD STORAGE**

Miftahul Huda Wafmi<sup>1)</sup>, Achadiyah Rachmawati<sup>2)</sup> and Suyadi<sup>2\*)</sup>

1) Undergraduate Student of Animal Husbandry Faculty Brawijaya University Malang

2) Lecture Faculty of Animal Husbandry Brawijaya University Malang

\*) Correspondence address, E-mail: suyadi@ub.ac.id

**ABSTRACT**

The objective of the research was to evaluate the influence of  $\alpha$ -tocopherol in egg yellow tris aminomethane base-diluents on the quality of spermatozoa in Maduran Cattle following cold storage. The material of the research was fresh semen of Madura Bulls 2 years age with minimal motility 70% collected in Indonesia Artificial Insemination Center Singosari, Malang. Semen was collected twice a week. The method of the research was a Block Randomized Design Experiment consisting four different levels of  $\alpha$ -tocopherol in the base diluents of 0 mM, 0,5 mM, 1 mM and 1,5 mM/ml with 10 replications each. The result of the research showed that the influence of  $\alpha$ -tocopherol addition in base diluents was not significantly differences between groups ( $P>0,05$ ) on viability, abnormality, and integrity of spermatozoa membrane. However, this treatments affected significantly ( $P<0,05$ ) on the motility of Madura Bulls spermatozoa membrane at cold storage, whereas the concentration of 1 mM/ml showed highest those than others. It was concluded that addition  $\alpha$ -tocopherol at concentration 1 mM/ml in egg yellow tris-aminomethane diluent can maintain the motility of Madura Bulls spermatozoa at cold storage.

Keywords: Spermatozoa of Madura cattle,  $\alpha$ -tocopherol, tris aminomethane, cold storage

**PENGARUH KONSENTRASI  $\alpha$ -TOCOPHEROL DALAM PENGECER TRIS AMINOMETHANE KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA SAPI MADURA PADA PENYIMPANAN DINGIN**

Miftahul Huda Wafmi<sup>1)</sup>, Achadiyah Rachmawati<sup>2)</sup> dan Suyadi<sup>2\*)</sup>

1) Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang

2) Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang

\*) Alamat korenspondensi: suyadi@ub.ac.id

**ABSTRAK**

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi pengaruh  $\alpha$ -tocopherol pada basis pengencer tris-aminometan kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi Madura pada penyimpanan dingin. Materi pada penelitian ini adalah semen segar sapi Madura yang berumur 2 tahun dengan tingkat motilitas minimal 70% yang diambil dari Pusat Inseminasi Buatan

Indonesia di Singosari, Malang. Semen diambil dua kali dalam seminggu. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah percobaan dengan Rancangan Acak Kelompok yang terdiri dari empat level *α-tocopherol* yang berbeda dalam basis pengencer pada 0 mM, 0,5 mM, 1 mM dan 1,5 mM/ml dengan masing-masing 10 kali pengulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengaruh penambahan *α-tocopherol* pada basis pengencer tidak memberikan perbedaan yang signifikan ( $P>0,05$ ) antara kelompok viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran spermatozoa. Tetapi, perlakuan ini berpengaruh secara signifikan ( $P<0,05$ ) terhadap motilitas membran spermatozoa sapi Madura pada penyimpanan dingin, sedangkan pada konsentrasi 1 mM/mL menunjukkan hasil yang paling tinggi dari pada yang lainnya. Dapat disimpulkan bahwa penambahan *α-tocopherol* pada konsentrasi 1 mM/ml dalam pengencer *tris-aminometan* kuning telur dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Madura pada penyimpanan dingin.

Kata kunci : Spermatozoa sapi Madura, *α-tocopherol*, *tris aminomethane*, penyimpanan dingin.

## PENDAHULUAN

Sapi Madura merupakan plasma nutfah yang dilindungi dan dipertahankan kemurniannya di pulau Madura yang perlu mendapat perhatian dalam rangka pelestarian jenisnya. Sapi Madura memiliki keunggulan yaitu mampu hidup dan berkembang biak pada kondisi suhu relatif panas dengan keadaan pakan yang kurang baik, memiliki daging dan persentase karkas yang empuk. Kondisi lapangan menunjukkan usaha untuk melestarikan masih minim, yang sebenarnya mempunyai potensi untuk dikembangkan (Tuhu, Ondho dan Samsudewa., 2013). Usaha ternak sapi Madura di Indonesia membutuhkan perhatian khusus dalam kaitannya dengan upaya mempertahankan dan menunjang peningkatan populasi ternak. Guna peningkatan populasi tersebut maka dilakukan pemanfaatan teknologi reproduksi peternakan melalui teknik Inseminasi Buatan (IB) dengan menggunakan semen cair (Kaiin, Gunawan, Said dan Tappa., 2004).

Kendala IB adalah rendahnya kualitas semen sapi Madura disebabkan oleh kerusakan membran plasma spermatozoa

akibat peroksidasi lipid, sehingga dibutuhkan antioksidan yang dapat mengurangi terjadinya peroksidasi lipid dengan menggunakan *α-tocopherol* merupakan satu komponen sistem antioksidan pada semen yang paling aktif menangkap peroksil radikal dengan memberikan atom hidrogennya sehingga menjadi radikal baru yang bersifat lebih stabil yang dapat menghambat terjadinya peroksida lipid (Linder, 1992). Alawiyah dan Hartono (2006) berpendapat bahwa penambahan *α-tocopherol* dapat mempertahankan kualitas semen beku pada kambing boer. Fungsi *α-tocopherol* yang ditambahkan dalam bahan pengencer berfungsi sebagai superoksida dismute dan peroksidase sehingga dapat menghilangkan anion superoksida dan meminimalkan kerusakan peroksidatif karena proses peroksidasi merubah struktur spermatozoa terutama pada bagian akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler (reaksi akrosom). Dorota dan Kurpirsz (2004) berpendapat bahwa oksidasi fosforilasi yang terganggu menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Spesies (ROS)*

semen. Kadar *ROS* yang tinggi dalam sel dapat mengoksidasi lipid, protein dan DNA (*Deoxyribonucleic Acid*). Lipid membran plasma semen sangat rentan terhadap *ROS*.

Arifianti dan Yusuf (2006) menyatakan bahwa untuk meminimalkan kerusakan sel spermatozoa dapat dilakukan dengan menambahkan bahan pengencer *tris aminomethane* yang mengandung kuning telur yang dapat melindungi spermatozoa selama proses pendinginan yang mempunyai kemampuan sebagai sistem penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah. Pengencer *tris aminomethane* kuning telur telah banyak digunakan dalam penelitian pengenceran dan pembekuan semen serta terbukti mampu mempertahankan kualitas semen pada suhu dingin. Hal ini didukung oleh pernyataan Hafez (1993) menyatakan bahwa penggunaan pengencer *tris aminomethane* pada semen cair dapat mempertahankan perubahan pH, tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit, ditambahkan juga oleh Toelihere (1993) bahwa penambahan kuning telur pada pengencer *tris aminomethane* diperlukan karena didalam kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi integritas sel sperma dari *cold shock* pada suhu penyimpanan 5°C serta berfungsi untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa dan sebagai *buffer* (penyangga) dari perubahan pH bahan pengencer.

Penyimpanan semen cair dalam waktu lama pada suhu 5 °C mempunyai daya tahan hidup spermatozoa lebih pendek di dalam lingkungan oksigen daripada dalam lingkungan nitrogen. Hal tersebut berkaitan dengan fungsi oksigen sebagai unsur oksidatif dalam proses metabolisme yang

menghasilkan produk sisa oksidasi metabolisme yang membahayakan seperti hidrogen peroksida. Gazali dan Tambing (2002) menyebutkan bahwa peroksida lipid berperan utama dalam proses penuaan, memperpendek daya hidup spermatozoa, menginduksi perubahan struktur terutama pada daerah akrosom dan penurunan motilitas secara cepat.

Berdasarkan informasi tersebut, tentang pengaruh *α-tocopherol* dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur dan kaitannya dengan mempertahankan kualitas spermatozoa pada penyimpanan dingin, sehingga melalui penelitian ini diharapkan dapat mengetahui pengaruh penambahan dosis *α-tocopherol* yang tepat untuk mempertahankan kualitas semen cair sapi Madura.

## MATERI DAN METODE

Materi yang digunakan dalam penelitian adalah semen segar sapi Madura umur 2 tahun dengan motilitas minimal 70% yang ditampung di BBIB Singosari seminggu dua kali menggunakan bahan pengencer *tris aminomethane* kuning telur dan penambahan antioksidan berupa vitamin E (*α-tocopherol*).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah percobaan laboratorium dengan empat perlakuan dan sepuluh kali ulangan menggunakan analisis rancangan acak kelompok berdasarkan hari pengambilan semen dengan metode eksperimental menggunakan uji sidik ragam *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila hasil yang diperoleh melalui analisis ragam menunjukkan adanya pengaruh nyata dari antar perlakuan ( $0,05 < P < 0,01$ ), maka diuji

lebih lanjut dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk menentukan perlakuan dosis  $\alpha$ -*tocopherol* yang paling baik digunakan (Tuhi dkk., 2013).

Penampungan semen sapi Madura dua kali seminggu di BBIB Singosari menggunakan vagina buatan. Air panas suhu 50-60°C dimasukkan sampai 2/3 penuh melalui lubang pada pertengahan silinder dan selongsong, suhu dibiarkan turun sampai 45°C dan ditambahkan tekanan bagian dalam vagina dengan cara meniupkan atau memompakan udara melalui pentil silinder. Kemudian, bagian pangkal vagina buatan dioleskan bahan pelicin (*vaselin*) 1/3 panjang vagina buatan.

Kualitas semen segar diuji kualitasnya secara makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, pH dan konsistensi. Pemeriksaan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas individu dan massa, viabilitas, abnormalitas, dan integritas membran spermatozoa (*HOST*).

Pengenceran semen dilakukan dengan menambahkan bahan-bahan pengencer *tris aminomethane* kuning telur yang akan digunakan untuk pengenceran semen. Semen yang telah diencerkan dapat dihitung volume pengencerannya yaitu, sebagai berikut :

$$Vol\ pengenceran = \frac{Konsentrasi\ semen\ x\ 10jt}{25\ x\ 10jt}$$

Tabel 1. Penambahan  $\alpha$ -*tocopherol*

Perlakuan	Keterangan
P0	0 mM dalam 100 ml pengencer <i>tris amonimethane</i> kuning telur
P1	0,5 mM dalam 100 ml pengencer <i>tris amonimethane</i> kuning telur
P2	1 mM dalam 100 ml pengencer <i>tris amonimethane</i> kuning telur
P3	1,5 mM dalam 100 ml pengencer <i>tris amonimethane</i> kuning telur

Semen yang telah dimasukkan dengan *disposable syringe* 1 ml ke dalam *straw* 0,25 ml dan *straw* di *sealing* menggunakan pinset dan bunsen yang dipanaskan *straw* kemudian didinginkan pada suhu 5°C selama satu jam dalam refrigerator. Semen diamati secara mikroskopis, meliputi: motilitas individu, viabilitas, abnormalitas dan *HOST*. Masing-masing perlakuan dilakukan sepuluh kali pengulangan. Perlakuan pendinginan dapat mengakibatkan membran plasma spermatozoa menjadi lebih permeabel, sehingga mudah kehilangan enzim-enzim dan komponen-komponen yang terdapat

dalam kepala (Bilodeau, Chatterjee, Sorard and Gagnon., 2000).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Evaluasi Semen Segar Sapi Madura

Semen dievaluasi untuk mengetahui kualitas semen dalam keadaan segar sebelum dilakukan perlakuan. Hasil pengamatan semen segar setelah penampungan selama penelitian dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik semen segar sapi Madura

Variabel	Rataan
<b>Makroskopis :</b>	
Volume (ml)	3±0,38
Bau	Khas
Warna	Putih susu
pH	7
Konsistensi	Kental
<b>Mikroskopis :</b>	
Motilitas massa (%)	2+
Motilitas Individu (%)	73±2,58
Viabilitas (%)	95,40±2,39
Abnormalitas (%)	4,91±2,75
HOST (%)	78,83±10,61
Konsentrasi (x 10 <sup>6</sup> )	1814,60±297,40

Kartasudjana (2001) menyatakan bahwa evaluasi atau pemeriksaan semen merupakan suatu tindakan yang perlu dilakukan untuk melihat kuantitas (jumlah) dan kualitas semen. Pemeriksaan semen dibagi menjadi dua, yaitu pemeriksaan secara makroskopis dan pemeriksaan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis, yaitu pemeriksaan semen secara garis besar tanpa memerlukan alat bantu yang rumit, sedangkan pemeriksaan mikroskopis yaitu untuk melihat kondisi semen lebih dalam lagi serta memerlukan alat bantu yang cukup lengkap.

Setiap perkawinan, volume semen sangat menentukan jumlah spermatozoa yang diperlukan untuk pembuahan. Berdasarkan hasil pemeriksaan makroskopis didapatkan volume rata-rata lima ejakulat yang digunakan adalah 3±0,38 ml (Tabel 2). Rokhana (2008) melaporkan bahwa volume semen segar sapi Madura sebesar 4,78±1,48 ml. Feradis (2010) melaporkan bahwa perbedaan volume semen segar

dipengaruhi ukuran testis antar bangsa yang berbeda.

Bau semen segar sapi Madura pada saat penelitian didapatkan bahwa bau khas ternak. Bau tersebut menunjukkan semen tersebut dalam keadaan normal. Menurut Kartasudjana (2001) semen yang normal, pada umumnya mempunyai bau amis yang khas disertai bau dari hewan tersebut.

Warna semen erat hubungannya dengan kekentalan semen (Ramsiyati, 2004). Jika semen semakin encer maka warnanya akan semakin pucat. Hasil penelitian diperoleh bahwa rata-rata warna semen sapi Madura adalah putih susu, hal ini dikarenakan konsistensi semen kental sehingga mempunyai warna putih susu. Hasil ini sesuai dengan pendapat Kartasudjana (2001) yang menyatakan bahwa bahwa semen sapi umumnya berwarna putih susu atau krem dengan konsistensi kental.

Pengamatan derajat keasaman (pH) yang didapatkan dalam penelitian diperoleh

rata-rata sebesar 7 (Tabel 2). Penelitian Rokhana (2008) didapatkan pH semen sapi Madura sebesar  $6,37 \pm 0,11$  dan Umiyasih (1999) melaporkan rata-rata pH sekitar 6,7. Menurut Garner dan Hafez (2000) semen umumnya mempunyai pH sekitar 6,4–7,8. Derajat keasaman (pH) sangat mempengaruhi daya tahan hidup spermatozoa karena erat kaitannya dengan metabolisme spermatozoa, oleh sebab itu sangat penting diketahui derajat keasaman semen untuk tetap menjaga semen dalam keadaan pH netral sehingga daya tahan spermatozoa dapat dipertahankan. Hasil dari penelitian ini dengan penilaian derajat keasaman (pH) merupakan angka derajat keasaman (pH) normal.

Kekentalan semen berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa (Ramsiyati, 2004). Hasil penelitian didapatkan konsistensi semen sapi Madura adalah kental. Hasil ini sesuai dengan pendapat Kartasudjana (2001) yang menyatakan bahwa semen sapi umumnya merupakan semen yang sangat kental sampai kental. Kekentalan atau konsistensi merupakan salah satu sifat semen yang memiliki kaitan dengan kepadatan atau konsentrasi spermatozoa didalamnya, semakin kental semen dapat diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi spermatozoanya.

Gerakan massa spermatozoa merupakan petunjuk derajat keaktifan bergerak spermatozoa (sebagai indikator tingkat atau persentase spermatozoa hidup dan aktif dalam semen (Kartasudjana, 2001). Motilitas massa semen segar sapi Madura pada saat penelitian diperoleh sebesar 2+, hal ini dapat dikatakan bahwa motilitas massa semen segar sapi Madura adalah baik

karena menurut Toelihere (1993) kriteria ketebalan gelombang, yaitu (1) sangat baik (+++), yaitu gelombang besar, tebal dan aktif; (2) baik (++), yaitu gelombang kecil, tipis dan jarang; (3) sedang (+), gelombang aktif dan progresif; dan (4) buruk (0) yaitu tidak ada gerakan individu. Gerakan massa spermatozoa dalam satu kelompok mempunyai kecenderungan bergerak ke satu arah dengan membentuk gelombang, ketebalan gelombang dapat digunakan sebagai indikator jumlah spermatozoa di dalam semen.

Motilitas atau daya gerak spermatozoa digunakan sebagai ukuran kesanggupan untuk membuahi sel telur (Ax dkk., 2000). Perkiraan motilitas adalah prosedur visual dan dinyatakan secara komparatif, tidak mutlak. Motilitas spermatozoa di dalam suatu contoh semen ditentukan secara keseluruhan atau sebagai rata-rata dari suatu populasi spermatozoa. Dalam penelitian motilitas individu semen segar sapi Madura sebesar  $73 \pm 2,58\%$ , sedangkan Rokhana (2008) melaporkan rata-rata persentase motilitas sapi Madura sebesar  $62,45 \pm 15,11\%$ . Herwiyanti (2004) menyatakan bahwa motilitas semen segar pejantan sapi Madura mempunyai rata-rata yang lebih tinggi daripada semen bangsa sapi potong lainnya. Hal ini dikarenakan bangsa sapi Madura merupakan bangsa sapi lokal Indonesia yang memiliki daya adaptasi yang sangat baik terhadap kondisi lingkungan, pakan serta tahan terhadap cuaca, sehingga pejantan bangsa sapi Madura memiliki kondisi kesehatan termasuk kondisi reproduksi yang cukup baik.



Persentase viabilitas semen segar hasil penelitian sapi Madura sebesar  $95,40 \pm 2,39\%$ . Rokhana (2008) melaporkan bahwa rata-rata persentase viabilitas sapi Madura sebesar  $69,73 \pm 16,69\%$ . Spermatozoa yang masih hidup tidak berwarna sedangkan yang sudah mati berwarna merah. Hal ini disebabkan membran kepala spermatozoa yang sudah mati tidak stabil, sehingga mudah menyerap warna (Bansal dan Bilaspuri, 2008). Hasil tersebut lebih tinggi dibanding penelitian Rokhana (2008) diduga sapi Madura yang diambil semennya memiliki umur lebih muda. Campbell, dkk. (2003) menyatakan bahwa persentase spermatozoa hidup lebih tinggi daripada persentase spermatozoa motil karena spermatozoa yang hidup belum tentu motil, tetapi sejumlah spermatozoa yang tidak motil terkadang masih hidup.

Abnormalitas adalah keadaan yang tidak normal dari spermatozoa yang meliputi kelainan pada kepala (kepala dua, terlalu kecil atau besar), ekor dan kepala terpisah dari ekor dan lain-lain. Persentase abnormalitas spermatozoa semen segar sapi Madura pada saat penelitian sebesar  $4,91 \pm 2,75\%$ , jumlah ini lebih baik dari hasil Rokhana (2008) yang melaporkan bahwa abnormalitas spermatozoa sapi Madura sebesar  $6,78 \pm 3,33\%$ .

Persentase *Hypo Osmotic Swelling Tes (HOST)* spermatozoa semen segar sapi Madura pada saat pengamatan sebesar  $78,83 \pm 10,61\%$ . Syahrudin, dkk. (2005) melaporkan bahwa persentase membran plasma utuh sapi Simental sebesar  $84,1\%$ . Hasil penelitian tentang persentase *HOST* yang diperoleh lebih rendah dibanding pustaka, hal ini diduga karena faktor *breed*

Sapi mempengaruhi kualitas semen, kualitas semen Sapi Simental (sapi eksotik) lebih bagus dibanding sapi lokal, terutama sapi Madura dan juga proses pendinginan mempengaruhi kestabilan membran kepala spermatozoa. Mackie, dkk. (2001) menyatakan bahwa membran plasma spermatozoa tersusun oleh protein dan fosfolipid. Umumnya sel akan menggunakan mekanisme tertentu untuk mencegah kerusakan membran yang tidak terkontrol yang berfungsi untuk menjaga organel sel dan mengatur lalu lintas keluar masuk sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses biokimia sel.

Konsentrasi spermatozoa sapi Madura pada saat penelitian adalah  $1814,60 \pm 297,40$  juta/ml. Jumlah ini lebih besar dari yang dilaporkan Rokhana (2008) konsentrasi spermatozoa sapi Madura sebesar  $1134,86 \pm 460,64$  juta/ml. Menurut Garner dan Hafez (2000) konsentrasi spermatozoa yang baik berkisar antara  $2000-2200 \times 10^6$  spermatozoa/ml dan konsentrasi spermatozoa pada penelitian masih dibawah angka tersebut dengan rata-rata konsentrasi  $1814 \times 10^6$  spermatozoa/ml semen masih dapat diolah lebih lanjut.

Total spermatozoa motil semen segar sapi Madura dari hasil penelitian sebesar  $1324,65 \times 10^6$ . Rokhana (2008) melaporkan bahwa total spermatozoa motil sapi Madura sebesar  $3519,94 \times 10^6$ . Hal ini menunjukkan bahwa total spermatozoa motil pada penelitian ini mempunyai hasil yang lebih rendah dibanding pustaka, diduga perbedaan hasil tersebut dipengaruhi oleh beberapa faktor terutama adanya perbedaan manajemen pemeliharaan pejantan sapi

Madura yang dipakai dalam kedua penelitian tersebut.

### Kualitas Semen Sapi Madura Setelah Penyimpanan pada Suhu yang Berbeda

Setelah dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen segar, semen dibagi dalam empat perlakuan penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur. Semen diencerkan sebanyak empat kali, semen yang diencerkan pada pengencer

*tris aminomethane* kuning telur tanpa penambahan *α-tocopherol* (P0); 0,5 mM (P1); 1 mM (P2); dan 1,5 mM (P3).

Hasil uji kualitas spermatozoa sapi Madura dengan pengaruh konsentrasi *α-tocopherol* dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur pada penyimpanan suhu ruang dan dingin setelah prosesing semen meliputi; persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas dan *Hypo Osmotic Swelling Tes (HOST)*.

Tabel 3. Rataan persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas dan *HOST* spermatozoa pada berbagai konsentrasi *α-tocopherol* dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur

Variabel	Perlakuan			
	P0 (0 mM)	P1 (0,5 mM)	P2 (1 mM)	P3 (1,5 mM)
<b>Motilitas (%) :</b>				
Pengenceran	67±4,20	63±5,37	67±2,58	64±3,94
Pendinginan	53,50±4,11 <sup>a</sup>	54±3,94 <sup>ab</sup>	59±3,94 <sup>c</sup>	55±4,08 <sup>ab</sup>
<b>Viabilitas (%) :</b>				
Pengenceran	91,05±3,17	90,87±5,32	91,97±3,63	91,42±4,07
Pendinginan	84,80±9,09	87,60±7,28	82,40±12,17	89,20±6,54
<b>Abnormalitas (%) :</b>				
Pengenceran	17,74±4,20	19,13±5,01	14,85±1,77	18,22±4,14
Pendinginan	28,32±4,93	29,15±4,67	23,90±3,08	27,55±3,43
<b>HOST (%) :</b>				
Pengenceran	51,11±27,33	50,79±33,22	59,77±26,03	55,61±26,79
Pendinginan	58,90±30,40	57,90±28,41	51,60±31,00	50,80±21,86

Keterangan : Notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P<0,05)

### Motilitas Spermatozoa

Perbandingan spermatozoa hidup yang bergerak ke depan dengan konsentrasi spermatozoa total dalam semen menunjukkan persentase spermatozoa motil progresif. Widiastuti (2001) berpendapat bahwa motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa mempunyai peranan yang

penting untuk keberhasilan fertilisasi. Nugroho (2003) menambahkan bahwa motilitas atau daya gerak dapat dijadikan patokan dalam menilai kualitas semen.

Persentase motilitas spermatozoa setelah pengenceran menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* 0 mM (P0) dan 1 mM (P2) mempunyai hasil motilitas yang



sama besar bila dibandingkan dengan penambahan *α-tocopherol* 0,5 mM (P1) dan 1,5 mM (P3). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa ( $P>0,05$ ). Hal ini berarti semen yang ditambah *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas motilitas spermatozoa pada penyimpanan suhu ruang. Pada temperatur kamar terjadi peningkatan metabolisme seiring dengan peningkatan suhu, sedangkan pada temperatur lemari es metabolisme spermatozoa berlangsung lambat atau terjadi penurunan persentase motilitas spermatozoa. Hasil penelitian ini sesuai dengan literatur, dimana pada hasil pengenceran lebih tinggi dibandingkan dengan setelah penyimpanan dingin (Tabel 3). Bearden dan Fuquay (2004) mengemukakan bahwa cepatnya penurunan motilitas pada suhu kamar disebabkan oleh metabolisme berlangsung cepat sehingga perombakan glukosa dan fruktosa yang dibutuhkan sebagai sumber energi untuk pergerakan spermatozoa cepat habis.

Persentase motilitas spermatozoa setelah penyimpanan dingin dengan penambahan *α-tocopherol* dengan konsentrasi yang berbeda dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur diperoleh rata-rata sebesar  $53,50\pm 4,11$  (P0);  $54\pm 3,94$  (P1);  $59\pm 3,94$  (P2); dan  $55\pm 4,08$  (P3). Rataan persentase motilitas spermatozoa terbesar adalah sebesar  $59\pm 3,94$  (P2) yang merupakan perlakuan semen yang diencerkan dengan pengencer *tris aminomethane* kuning telur yang

ditambahkan *α-tocopherol* dengan dosis 1 mM dalam 100 ml pengencer. Berdasarkan uji Anova (*Analysis of variant*) menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas spermatozoa progresif setelah menerima perlakuan dengan penambahan *α-tocopherol* dan penyimpanan dingin selama satu jam memberikan hasil yang berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa ( $P<0,05$ ) pasca penyimpanan dingin. Hal ini berarti semen yang ditambah *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur dapat mempertahankan kualitas motilitas spermatozoa setelah penyimpanan dingin. Hasil ini sependapat dengan Iswara (2009) menyatakan bahwa penambahan vitamin E yang berupa *α-tocopherol* dapat meningkatkan kualitas persentase motilitas spermatozoa. Vitamin E ini berfungsi sebagai antioksidan dengan cara menetralkan radikal bebas dan menghambat peroksidasi lipid.

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Raharjo (2002) yang menyatakan bahwa motilitas spermatozoa didalam kemasan straw mini yang disimpan didalam lemari es mengalami penurunan yaitu dari 74,2-53,3%. Sugiarti, dkk. (2004) menyatakan bahwa penyimpanan dalam jangka waktu lama menyebabkan penurunan motilitas sperma akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH dan kondisi ini dapat bersifat racun terhadap spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa. *Tris aminomethane* sebagai *Buffer* yang berfungsi sebagai penyanggah untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa.

Proses respirasi pada metabolisme spermatozoa menghasilkan asam laktat. Semakin lama proses respirasi semakin banyak asam laktat yang dihasilkan. Asam laktat mempengaruhi penurunan kehidupan dan motilitas spermatozoa (Dirjennak, 2000). Daya tahan hidup spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama penyimpanan yang diperlihatkan melalui sanggunya bergerak sampai tidak adanya pergerakan lagi. Daya tahan hidup spermatozoa yang diamati dalam penelitian ini adalah kemampuan spermatozoa untuk bertahan hidup selama motilitas spermatozoanya masih berada diatas motilitas spermatozoa layak IB, yakni minimal 40%. Sedangkan persentase hidup dibawah 40% tidak lagi dilakukan pengamatan.

### **Viabilitas Spermatozoa**

Persentase spermatozoa hidup lebih tinggi daripada persentase spermatozoa motil karena spermatozoa yang hidup belum tentu motil, tetapi sejumlah spermatozoa yang tidak motil terkadang masih hidup (Campbell dkk., 2003). Perbandingan persentase viabilitas spermatozoa pada setiap tahap pengamatan dengan dosis *α-tocopherol* yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 3.

Persentase viabilitas spermatozoa setelah pengenceran dengan penambahan *α-tocopherol* dengan konsentrasi yang berbeda dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur diperoleh rata-rata sebesar sebesar 91,05±3,17 (P0); 90,87±5,32 (P1); 91,97±3,63 (P2); dan 91,42±4,07 (P3). Perlakuan semen yang diencerkan dengan pengencer *tris aminomethane* kuning telur

yang ditambahkan *α-tocopherol* dengan dosis 1 mM (P2) dalam 100 ml pengencer dengan rata-rata terbesar dibandingkan P0 (0 mM), P1 (0,5 mM) dan P3 (1,5 mM). Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer tidak berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa ( $P>0,05$ ). Hal ini berarti penambahan *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas viabilitas spermatozoa pada penyimpanan suhu ruang.

Rataan viabilitas spermatozoa pasca penyimpanan dingin yang diperoleh selama penelitian adalah 82,4-89,2%. Persentase viabilitas spermatozoa setelah penyimpanan dingin dengan penambahan *α-tocopherol* dengan konsentrasi yang berbeda dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur diperoleh rata-rata sebesar 84,80±9,09 (P0); 87,60±7,28 (P1); 82,40±12,17 (P2); dan 89,20±6,54 (P3). Rataan persentase viabilitas spermatozoa terbesar adalah sebesar 89,20±6,54% (P3) yang merupakan perlakuan semen yang diencerkan dengan pengencer *tris aminomethane* kuning telur yang ditambahkan *α-tocopherol* dengan dosis 1,5 mM dalam 100 ml pengencer. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer tidak berpengaruh terhadap viabilitas spermatozoa ( $P>0,05$ ). Hal ini berarti semen yang ditambah *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas viabilitas spermatozoa setelah penyimpanan dingin, diduga sudah terjadi peroksida lipid sebelum penambahan *α-tocopherol*. Hal ini sesuai dengan pendapat Beconi, dkk. (1993) menyatakan bahwa pada semen dengan

kualitas baik penambahan antioksidan akan mempertahankan daya hidup spermatozoa sapi, tetapi tidak pada semen dengan kualitas jelek karena proses peroksidasi yang sudah terjadi tidak dapat dihentikan dengan pemberian antioksidan.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa nilai viabilitas lebih tinggi dari nilai motilitas spermatozoa, hal ini didukung hasil penelitian McKinnon (1999) yang menyatakan bahwa penyimpanan pada suhu 5°C menyebabkan metabolisme spermatozoa menurun sehingga viabilitasnya dapat dipertahankan.

Penurunan sel hidup semen cair sejalan lamanya penyimpanan dapat disebabkan oleh berkurangnya energi untuk kelangsungan hidup dan motilitasnya. Penurunan sel hidup akibat kerusakan sel spermatozoa yang disebabkan metabolisme oksidatif spermatozoa dapat berlangsung pada kondisi penyimpanan *aerob* dan *anaerob* yang menghasilkan produk akhir asam laktat yang dapat merusak medium pengencer spermatozoa. Hal ini sesuai dengan Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa pada keadaan anaerobik spermatozoa bergantung seluruhnya pada perombakan fruktosa menjadi asam laktat sebagai sumber energi dan dalam kondisi *aerob* spermatozoa mendapat energi dari respirasi.

### **Abnormalitas Spermatozoa**

Persentase abnormalitas spermatozoa sapi Madura setelah pengenceran dan penyimpanan dingin pada setiap perlakuan tidak berpengaruh ( $P > 0,05$ ). Nilai terkecil abnormalitas pada penelitian ini adalah setelah pengenceran  $14,85 \pm 1,77\%$  (P2) dengan penambahan  *$\alpha$ -tocopherol* 1 mM dan

setelah penyimpanan dingin  $23,90 \pm 3,08\%$  (P2) dengan penambahan  *$\alpha$ -tocopherol* 1 mM (Tabel 3). Hasil penelitian persentase abnormalitas semen Sapi Madura dalam kisaran normal semen yang subur. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa abnormalitas kurang dari 20% masih dapat dipakai untuk inseminasi. Abnormalitas spermatozoa sapi melewati 30% sampai 35% menunjukkan ketidaksuburan pejantan tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian, persentase abnormalitas spermatozoa setelah pengenceran dengan penambahan  *$\alpha$ -tocopherol* dengan konsentrasi yang berbeda dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur diperoleh rata-rata sebesar  $17,74 \pm 4,20$  (P0);  $19,13 \pm 5,01$  (P1);  $14,85 \pm 1,77$  (P2); dan  $18,22 \pm 4,14$  (P3). Hasil penelitian menunjukkan bahwa abnormalitas spermatozoa paling rendah adalah P2 yang merupakan perlakuan semen dengan pengencer *tris aminomethane* kuning telur dengan penambahan  *$\alpha$ -tocopherol* 1 mM. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan  *$\alpha$ -tocopherol* dalam pengencer tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa ( $P > 0,05$ ). Hal ini berarti semen yang ditambah  *$\alpha$ -tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas abnormalitas spermatozoa pada penyimpanan suhu ruang.

Persentase abnormalitas spermatozoa setelah penyimpanan dingin dengan penambahan  *$\alpha$ -tocopherol* dengan konsentrasi yang berbeda dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur diperoleh rata-rata sebesar  $28,32 \pm 4,93$  (P0);  $29,15 \pm 4,67$  (P1);  $23,90 \pm 3,08$  (P2); dan  $27,55 \pm 3,43$  (P3). Rataan persentase abnormalitas spermatozoa

terendah adalah sebesar  $23,90 \pm 3,08$  (P2) yang merupakan perlakuan semen yang diencerkan dengan pengencer *tris aminomethane* kuning telur yang ditambahkan *α-tocopherol* dengan dosis 1 mM dalam 100 ml pengencer. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa ( $P > 0,05$ ). Hal ini berarti semen yang ditambah *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas abnormalitas spermatozoa setelah penyimpanan dingin.

#### ***Hypo Osmotic Swelling Tes (HOST) Spermatozoa***

Persentase *HOST* spermatozoa sapi Madura setelah pengenceran dan penyimpanan dingin pada setiap perlakuan tidak berpengaruh terhadap semua perlakuan ( $P > 0,05$ ). Hasil penelitian ini tidak dalam kisaran normal semen karena ada pada kisaran sekitar 50,79-59,77% (Tabel 3). Hal ini sesuai dengan pendapat Setiadi, dkk. (1993) yang menyatakan bahwa penilaian *HOST* dalam kisaran normal jika berada pada kisaran sekitar 62,6-82,6% pada semen sapi. Bailey, dkk. (2000) menyatakan bahwa perlakuan pendinginan dapat mengakibatkan membran plasma spermatozoa menjadi lebih permeabel sehingga mudah kehilangan enzim-enzim dan komponen-komponen yang terdapat dalam kepala sel.

Persentase hasil dari penelitian setelah pengenceran diperoleh rata-rata sebesar  $51,11 \pm 27,33$  (P0);  $50,79 \pm 33,22$  (P1);  $59,77 \pm 26,03$  (P2); dan  $55,61 \pm 26,79$  (P3). Hasil dari pengamatan menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* 1 mM (P2)

mempunyai nilai *HOST* paling besar yaitu  $59,77 \pm 26,03\%$ , bila dibandingkan dengan penambahan *α-tocopherol* 0 mM (P0), 0,5 mM (P1) dan 1,5 mM (P3). Hasil dari analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer tidak berpengaruh terhadap keutuhan membran plasma spermatozoa ( $P > 0,05$ ). Hal ini berarti semen yang ditambah *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas spermatozoa terhadap *HOST* pada penyimpanan suhu ruang.

Persentase *HOST* spermatozoa setelah penyimpanan dingin dengan penambahan *α-tocopherol* dengan konsentrasi yang berbeda dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur diperoleh rata-rata sebesar  $58,90 \pm 30,40$  (P0);  $57,90 \pm 28,41$  (P1);  $51,60 \pm 31,00$  (P2); dan  $50,80 \pm 21,86$  (P3). Rataan persentase *HOST* spermatozoa terbesar adalah sebesar  $58,90 \pm 30,40$  (P0) yang merupakan perlakuan semen yang diencerkan dengan pengencer *tris aminomethane* kuning telur tanpa penambahan *α-tocopherol*. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer tidak berpengaruh terhadap integritas membran spermatozoa ( $P > 0,05$ ). Hal ini berarti semen yang ditambah *α-tocopherol* pada pengencer *tris aminomethane* kuning telur tidak dapat mempertahankan kualitas spermatozoa terhadap keutuhan membran plasma setelah penyimpanan dingin. Kerusakan membran sel spermatozoa selama proses pendinginan dapat terjadi karena beberapa faktor diantaranya, pengaruh suhu dan pengaruh tekanan osmotik. Acker and

McGann (2003) menambahkan selama proses pendinginan terjadi pengeluaran ion-ion, dehidrasi yang hebat sehingga menyebabkan sel mengkerut dan akan merusak sel.

Keutuhan membran plasma bagi spermatozoa mutlak diperlukan untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilan untuk membuahi sel telur. Fungsi membran plasma tidak hanya sebatas melindungi organel-organel yang terdapat didalam sel, tetapi lebih dari itu, membran plasma mampu berfungsi sebagai filter yang baik bagi pertukaran zat intra dan ekstraseluler. Apabila membran plasma rusak, maka proses metabolisme akan terganggu yang pada gilirannya akan menimbulkan akibat yang fatal bagi spermatozoa (Saili, 1999). Sinha, dkk. (1996) mengemukakan bahwa tingginya nilai integritas membran yang diperoleh pada plasma semen sapi disebabkan karena kemampuannya dalam melindungi membran plasma lebih baik sehingga hanya sedikit fosfolipid membran plasma sperma yang mengalami peroksidasi. Akibat dari peroksidasi akan terbentuk peroksida lipid, yang bereaksi dengan radikal bebas dan merangsang terjadinya reaksi otokatilik yang menyebabkan rusaknya membran plasma.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Penambahan *α-tocopherol* dalam pengencer *tris aminomethane* kuning telur dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sapi Madura selama penyimpanan dingin.

2. Konsentrasi *α-tocopherol* 1 mM dalam 100 ml pengencer *tris aminomethane* kuning telur berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa sapi Madura pada penyimpanan dingin, sedangkan konsentrasi tersebut tidak berpengaruh pada viabilitas, abnormalitas dan integritas membran spermatozoa (*HOST*).

### Saran

Berdasarkan data hasil penelitian disarankan penelitian lebih lanjut menggunakan konsentrasi *α-tocopherol* 1 mM dan lama penyimpanan dingin yang bervariasi.

### DAFTAR PUSTAKA

- Acker, J.P. and L.E. McGann. 2003. Protective Effect of Intracellular Ice During Freezing. *Journal Cryobiology*. 46: 197-202.
- Alawiyah, D. dan M. Hartono. 2006. Pengaruh Penambahan Vitamin dalam Bahan Pengencer Sitrat Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Boer. *J.Indon.Trop.Anim.Agric*. 31 (1): 8-14.
- Arifiantini, I. dan T.L. Yusuf. 2006. Keberhasilan Menggunakan Tiga Bahan Pengencer Dalam Dua Jenis Kemasan Pada Proses Pembekuan Semen Sapi Frisien Holstein. *Majalah Ilmiah Peternakan*. 9 (3) : 89 – 93.
- Ax, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez and M.E. Bellin. 2000. Semen Evaluation. Dalam : Hafez B, ESE Hafez. *Reproduction In Farm*



- Animals . 7thed. Lippincott Williams And Wilkins, Philadelphia. Pp : 365-389.
- Bansal, A.K. and G.S. Bilaspuri. 2008. Effect of Manganese on Bovine Sperm Motility, Viability, and Lipid Peroxidation in Vitro. *Journal. Anim. Reprod.* 5(3):90-96.
- Bailey, J.L., Jean-Franc, O. Bilodeau and N. Cormier. 2000. Semen Cryopreservation in Minireview Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal Of Andrology.* Vol. 21, No. 1, Hal: 1-7.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 2004. Applied Animal Reproduction. Ed. Ke-5. Mississippi State University. USA.
- Beconi, M.T., C.R. Frarcia, N.G. Mora and M.A. Affranchino. 1993. Effect of Natural Antioxidant on Frozen Bovine Semen Preservation. *Journal Theriogenology.* 40: 841-851.
- Bilodeau, J.F., S. Chatterjee, M.A. Sorard and C. Gagnon. 2000. Levels of Antioxidants Defences are Decreased in Bovine Spermatozoa After a Cycle of Freezing and Thawing. *Journal Mol Reprod Dev.* 55 : 282-288.
- Champbell. J.R., K.L. Campbell and M.D. Kenealy. 2003. Artificial insemination. In : Anim. Sci. 4 th (Ed). Mc Graw-Hili. New York.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2000. Prosedur Tetap (Protap) Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- Dorota, S. and M. Kurpirsz. 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cell. *Journal Reproduction Biology and Endocrinology,* March 2:1-7.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta Bandung.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. Di dalam E.S.E. Hafez dan B. Hafez, editor. Reproduction in Farm Animals. Ed. Ke-7. Lippincott Willams and Wilkins, USA.
- Gazali, M. and S.N. Tambing. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati* 9: 27-32.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Herwiyanti, E. 2004. Pengaruh Tingkah Laku Sexual terhadap Kualitas Semen pada Berbagai Bangsa Sapi Potong. Tesis. Program Studi Ilmu Ternak. Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Iswara, A. 2009. Pengaruh Pemberian Antioksidan Vitamin C dan E Terhadap Kualitas Spermatozoa Tikus Putih Terpapar *Allethrin*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Negeri Semarang, Semarang.
- Kaiin, E.M., M. Gunawan, S. Said dan B. Tappa. 2004. Fertilisasi dan Perkembangan Oosit Hasil IVF dengan Sperma Hasil Pemisahan. Prosiding Seminar Nasional



- Teknologi Peternakan dan Veteriner, Bogor 4-5 Agustus, 2004 : 21-25.
- Kartasudjana, R. 2001. Teknik Inseminasi Buatan Pada Ternak. Tim Program Keahlian Budidaya Ternak. Departemen Pendidikan Nasional. Proyek Pengembangan Sistem dan Standar Pengelolaan SMK. Direktorat Pendidikan Menengah Kejuruan. Jakarta.
- Linder, M.C. 1992. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme. Cetakan I. Parakkasi A, Penerjemah; Linder M.C, editor. Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: Nutritional Biochemistry and Metabolism.
- Mackie, A.R., P.S. James, S. Ladha and R. Jones. 2001. Diffusion Barriers in Ram and Boar Sperm Plasma Membranes: Directionality of Lipid Diffusion Across the Posterior Ring. *Journal Biol Reprod.* 64(1):113-119
- McKinnon, A.O. 1999. Breeding and Its Technology - Now and The Future. *Dalam:* Arifiantini, I. 2006. Perservasi Semen dengan Modifikasi Pengencer dan Krioprotektan untuk Inseminasi Buatan pada Kuda. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Nugroho, W.E. 2003. Efektivitas Konsentrasi Kuning Telur dan Plasma Semen Pada Bahan Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Beku Saenen. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Raharjo, D.H. 2002. Daya Tahan Spermatozoa Semen Cair Sapi FH dalam Kemasan Straw Mini Menggunakan Pengencer Citrat Kuning Telur dan Skim Kuning Telur dengan Penambahan Fruktosa. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Ramsiyati, D.T., Sriyana dan B. Sudarmadi. 2004. Evaluasi Kualitas Semen Sapi Potong Pada Berbagai Umur Di Peternakan Rakyat. Prosiding Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian. Pusat Penelitian Dan Pengembangan Peternakan. Loka Penelitian Sapi Potong. Pasuruan.
- Rokhana, E. 2008. Hubungan Antara Jumlah False Mounting Dengan Produksi Semen Pejantan Sapi Madura. Staf Pengajar Program Studi Produksi Ternak Jurusan Peternakan. Fakultas Pertanian Universitas Islam Kediri. ISSN: 1693-6094.
- Saili, T. 1999. Efektivitas Peenggunaan Albumen Sebagai Medium Separasi Dalam Upaya Merubah Rasio Alamiah Spermatozoa Pembawa Kromosom X dan Y Pada Sapi. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Setiadi, M.A., I. Supriatna dan I. Arifianti. 1993. Pengujian Kesuburan Spermatozoa Sapi Dengan Larutan Hipoosmotik, Pros. Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus.
- Sinha, M.P., B.K. Singh and R.L. Prasad. 1996. The Effect of Glutation On Motility, Enzyme Leakage and Fertility of Frozen Goat Semen. *Journal. Anim. Reprod. Sci.* 41:237-243.

- Sugiarti, T., E. Triwulanningsih, P. Situmorang, R.G. Sianturi dan D.A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan Katalase Dalam Produksi Semen Dingin Sapi. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2004. Puslitbang Peternakan, Bogor.
- Syahrudin, S., M. Gunawan, E.M. Kaiin dan B. Tappa. 2005. Daya Tahan Hidup Sperma Cair Sapi Simmental yang Disimpan Dalam Straw Pada Temperatur 5°C. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian Bioteknologi-Lipi, Cibinong.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa, Cetakan Ke-3, Bandung.
- Tuhu, A.D., Y.S. Ondho dan D. Samsudewa. 2013. Pengaruh Perbedaan Waktu Pelepasan *Water Jacket* Dalam Proses Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Pada Tahap *Before Freezing* Dan *Post Thawing*. Fakultas Peternakan Dan Pertanian Universitas Diponegoro. Semarang. *Journal Animal Agricultural*, Vol. 2. No. 1, 2013, Hal 466-477.
- Umiyasih, U., L. Affandhy dan D.B. Wijono. 1999. Pengaruh Beberapa Bahan Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Madura Pada Berbagai Tingkatan Konsentrasi Spermatozoa. Seminar Nasional Peternakan Dan Veteriner. Instalasi Penelitian Dan Pengkajian Teknologi Pertanian Grati. Pasuruan.
- Widiastuti. E. 2001. Kualitas Semen Beku Sapi FH dengan Penambahan Antioksidan Vitamin C dan E. Skripsi. Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor.