

PENGARUH PENGGUNAAN BERBAGAI LEVEL KUNING TELUR BEBEK DALAM PENGECER MULBERRY (MIII) TERHADAP KUALITAS SEMEN CAIR BABI LANDRACE

*The Effect of Using Various Levels of Duck Egg Yolk in Mulberry Diluent (MIII) on the
Quality of Liquid Semen in Landrace Pig*

Rovianus Amaral*, Agustinus Ridlof Riwu, Aloysius Marawali, F. M. S. Telupere,
Fakultas Peternakan, Kelautan dan Perikanan, Universitas Nusa Cendana
Jl. Adisucipto Penfui, Kupang, NTT 85001, Indonesia
*Corresponding author: amaralrofi@gmail.com

ABSTRACT

The study aimed to determine the optimal level of duck egg yolk in Mulberry diluent (MIII) to preserve the liquid semen of Landrace pigs stored at 18-20°C. This study used fresh semen of 2 (two) year old Landrace pigs that were sexually mature and in a healthy condition accommodated using the glove hand method. The design of this study uses a complete randomized design (RAL) consisting of 5 treatments of 4 replicates so that it becomes 20 experimental units. T₀: MIII 100%+KTB 0%, T₁: MIII 95%+KTB 5%, T₂: MIII 90%+KTB 10%, T₃: MIII 85%+15% KTB, T₄: MIII 80%+20% KTB. Diluted cement is evaluated every 8 hours Storage is carried out until the motility value reaches 40%. The variables tested included motility, viability, abnormality, and survival of spermatozoa. The data obtained was analyzed using variant analysis (ANOVA) and continued with the Duncan test. The T₃ treatment showed a significant difference (P<0.05) compared to other treatments. Spermatozoa motility: 46.25±2.50%, spermatozoa viability: 44.33±3.40%, spermatozoa abnormality: 6.47±2.88, and survival 36.33±2.52 hours. The conclusion of this study shows that the addition of 15% duck egg yolk in 85% MIII diluent is the best diluent to maintain the quality of liquid semen of Landrace pigs.

Keywords: Landrace pigs, Duck egg yolk, Mulberry diluent, Spermatozoa

ABSTRAK

Tujuan penelitian untuk mengetahui level kuning telur bebek yang optimal dalam pengencer Mulberry (MIII) guna mengawetkan semen cair babi Landrace yang disimpan pada suhu 18 sampai dengan 20°C. Penelitian ini menggunakan semen segar babi Landrace umur dua tahun yang sudah dewasa kelamin dan dalam kondisi sehat yang ditampung menggunakan metode manual (*glove hand method*). Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) terdiri dari lima perlakuan dan empat ulangan sehingga menjadi 20 unit percobaan. P₀: MIII 100%+ kuning telur bebek 0%, P₁: MIII 95%+kuning telur bebek 5%, P₂: MIII 90%+kuning telur bebek 10%, P₃: MIII 85%+15% kuning telur bebek, P₄: MIII 80%+20% kuning telur bebek. Semen yang sudah diencerkan dievaluasi setiap 8 jam Penyimpanan dilakukan hingga nilai motilitas mencapai 40%. Variabel yang diuji meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan daya tahan hidup spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Pada P₃ menunjukkan perbedaan yang signifikan (P<0,05) dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Motilitas spermatozoa: 46,25±2,50%, viabilitas spermatozoa: 44,33±3,40%, abnormalitas spermatozoa: 6,47±2,88, dan daya tahan hidup 36,33±2,52 jam. Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan 15% kuning telur bebek dalam pengencer MIII 85% merupakan pengencer terbaik untuk mempertahankan kualitas semen cair babi Landrace.

Kata kunci: Babi Landrace, Kuning telur bebek, Pengencer Mulberry, Spermatozoa

PENDAHULUAN

Kualitas spermatozoa merupakan faktor penting yang menentukan keberhasilan program inseminasi buatan (IB) pada ternak babi. Sebelum melakukan IB, semen babi perlu diencerkan terlebih dahulu. Jika semen tidak diencerkan, motilitas, viabilitas, dan daya hidup spermatozoa akan menurun selama penyimpanan. Salah satu masalah utama dalam penyimpanan semen adalah *cold shock*, yang merujuk pada kerusakan spermatozoa akibat suhu dingin. Hafez (2000) menyatakan bahwa menyimpan spermatozoa pada suhu rendah dapat merusak integritas membran spermatozoa, yang berakibat pada penurunan motilitas, viabilitas serta meningkatkan abnormalitas spermatozoa. Salah satu metode untuk menjaga kualitas spermatozoa adalah dengan menambahkan bahan pengencer pada semen. Pengencer ini berfungsi untuk melindungi spermatozoa pada suhu rendah (Nur *et al.*, 2023). Bahan pengencer yang digunakan untuk menyimpan spermatozoa harus memenuhi beberapa persyaratan penting. Bahan tersebut harus dapat menyediakan nutrisi yang dibutuhkan spermatozoa selama penyimpanan, mendukung pergerakan progresif spermatozoa, tidak bersifat toksik, berfungsi sebagai penyangga dan melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*) pada semen cair.

Bustani dan Baiee (2021), menyatakan bahwa spermatozoa tidak dapat bertahan lama tanpa bahan pengencer yang menyediakan nutrisi sebagai sumber energi, melindungi dari *cold shock*, dan berfungsi sebagai penyangga untuk mencegah perubahan pH akibat produksi asam laktat dari metabolisme spermatozoa.

Dalam penelitian ini, digunakan bahan pengencer Mulberry (MIII), yang memiliki masa simpan menengah dan dapat bertahan selama 5 sampai 7 hari (Zhou *et al.*, 2004). Pengencer MIII

mengandung Bovine Serum Albumin (BSA) yang berperan dalam menjaga stabilitas pH dan tekanan osmotik, serta melindungi spermatozoa dari efek suhu rendah. Selain itu, glisin dalam pengencer ini berfungsi sebagai protein yang penting bagi sperma, terutama selama penyimpanan, memberikan cadangan nutrisi yang dibutuhkan sperma untuk bertahan hidup (Johnson *et al.*, 2000). Menurut Susilawati *et al.* (2018) menambahkan bahwa pengencer juga dapat melindungi sperma dari kerusakan yang disebabkan oleh suhu dingin.

Bovine Serum Albumin (BSA) telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh Toelihere (1977), yakni sederhana dalam proses pembuatannya, memiliki daya pengawetan yang tinggi, tidak beracun, dan memungkinkan untuk melakukan penilaian sperma setelah dilakukan pengenceran dengan mudah. Menurut Gadea (2003), BSA mengandung 20 jenis asam amino. Dalam hal kandungan asam amino, BSA memiliki komposisi yang lebih lengkap dibandingkan dengan plasma semen, yang terjadi akibat proses pengenceran. Hal ini membantu menjaga stabilitas membran sel spermatozoa.

Kuning telur bebek memiliki kandungan gizi yang lebih tinggi dibandingkan dengan telur dari unggas lainnya, termasuk magnesium, sodium, fosfor, dan selenium per 100 gram. Berdasarkan penelitian Bebas dan Gorda (2016), kadar kolesterol dalam kuning telur bebek lebih baik dibandingkan dengan kuning telur ayam dan burung puyuh. Selain itu, kuning telur bebek memiliki kandungan gizi yang lebih baik dibandingkan dengan kuning telur lainnya, termasuk 17,0 gram protein, 0,8 gram karbohidrat, 35,0 gram lemak, 47,0% kadar air, 150 mg kalsium, 399 Kkal energi, 2870 IU vitamin A, 0,6 mg vitamin B1, dan 400 mg fosfat per 100 gram, seperti yang disebutkan oleh Direktorat Gizi, Departemen Kesehatan Republik Indonesia pada tahun 2004. Kuning telur bebek memiliki keunggulan

karena mengandung lipoprotein dan lesitin yang berfungsi sebagai penyangga untuk menjaga dan mengatur pH tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat optimal kuning telur bebek dalam pengencer Mulberry (MIII) dalam menjaga kualitas spermatozoa.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Yayasan William dan Laura, yang terletak di Kabupaten Kupang, Kecamatan Kupang Tengah, Desa Oenlasi selama enam minggu yang terbagi dalam periode persiapan dan periode pengumpulan data.

Materi Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah semen segar yang diperoleh dari penampungan babi jantan dengan umur 2 tahun yang memiliki kondisi tubuh proporsional, sehat, dan organ reproduksi normal (testisnya simetris) serta sudah terlatih untuk penampungan semen jenis pengencer yang digunakan adalah pengencer Mulberry (MIII) dan penambahan level kuning telur bebek yang berbeda.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan empat ulangan sehingga terbentuk 20 unit percobaan. Kelima perlakuan tersebut.

Tahap Persiapan Pengencer

Pembuatan kuning telur bebek

Pembuatan kuning telur bebek dimulai dengan membersihkan kulit telur menggunakan alkohol 70% dan membiarkannya kering. Setelah kering, langkah berikutnya adalah memecahkan kulit telur dari sudut yang runcing dan memisahkan kuning telur dari putih telur. Kemudian, letakkan kuning telur yang masih terbungkus selaput vitelinnya di

atas kertas saring. Kertas saring kemudian dimiringkan dan diputar perlahan-lahan hingga putih telurnya diserap oleh kertas saring. Setelah selaput vitelinnya kering, masukkan kuning telur ke dalam gelas ukur dan tutup menggunakan kertas aluminium foil. Dengan demikian, kuning telur siap digunakan.

Penyiapan pengencer MII

MIII ditimbang sebanyak 50 gram, kemudian dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer dan tambahkan 1000 mL aquades lalu dihomogenkan menggunakan stirrer dan spin bad. Setelah dihomogenkan MIII siap digunakan sebagai stok.

Tahap penampungan semen

Semen yang diperoleh dari Penampungan babi jantan dengan umur 2 tahun yang memiliki kondisi tubuh proporsional dan sehat, organ reproduksi normal (testisnya simetris) serta sudah terlatih untuk penampungan semen. Penampungan semen dilakukan dengan cara pemijatan, sebelum melakukan pengambilan semen pastikan babi dalam kondisi bersih. Tahap penampungan semen yakni babi jantan dipindahkan ke kandang yang terdapat betina tiruan (*dummy*), lalu siapkan tabung penampung yang ditutup menggunakan kain kasa. Penggunaan kain kasa bertujuan untuk menyaring gelatin agar semen tidak tercampur dengan gelatin. Sebelum melakukan pemijatan preputium harus dibersihkan, setelah itu dilakukan penampungan pada saat pejantan sudah menaiki dummy.

Pengenceran dan penyiapan semen

Pengencer MIII yang telah disiapkan 50 gram ditambahkan dengan level kuning telur bebek P1 5%, P2 10%, P3 15%, P4 20%, lalu dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer. Sesudah dihomogenkan, pengencer ditambahkan antibiotik sebanyak 1000 IU untuk penicilin dan 1 mg untuk streptomycin. Kemudian bagikan dalam 5 tabung

dengan setiap tabung 3 mL. Setelah semen dievaluasi pasca pengencer, terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Semen yang telah dievaluasi dimasukkan kedalam eppendorf, dibungkus dengan palastik, disimpan dalam coolbox pada suhu 18smpai 0°C yang dikontrol dengan termometer dan evaluasi semen dilakukan setiap 8 jam.

Tahap evaluasi makroskopis dan mikroskopis

Semen yang diperoleh dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis. Secara makroskopis adalah evaluasi yang dilakukan terhadap volume semen, warna semen, bau semen, konsistensi semen, dan pH semen. Secara mikroskopis adalah evaluasi yang dilakukan terhadap motilitas, viabilitas abnormalitas, dan daya tahan hidup spermatozoa.

Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini variabel yang digunakan adalah motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan daya tahan hidup spermatozoa.

Motilitas spermatozoa

Motilitas spermatozoa adalah kemampuan spermatozoa untuk bergerak secara progresif, yang dapat diamati melalui mikroskop dengan pembesaran 10×40. Penilaian motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan memberikan nilai berkisar antara 0 sampai 100%, (Arifiantini, 2012), di mana sperma yang tidak bergerak dikategorikan sebagai yang sudah mati, sementara yang bergerak progresif dikategorikan sebagai yang hidup. Penilaian dilakukan dengan melihat tiga lapang pandang.

Viabilitas spermatozoa

Viabilitas spermatozoa yaitu daya hidup spermatozoa sebagai indikator kualitas spermatozoa (Sukmawati *et al.*, 2014). Untuk pengamatan viabilitas dapat

dinyatakan dalam persentase dengan pewarnaan diferensial serat menggunakan zat pewarna eosin dengan cara teteskan semen diatas gelas objek, lalu satu tetes semen ditambahkan lagi pada gelas objek yang sudah ditetesi dengan pewarna eosin. Langkah selanjutnya campurkan secara merata lalu diulasi menggunakan objek gelas lainnya kemudian amati viabilitas spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran 10x40. Sperma yang hidup biasanya memiliki kepala yang tidak berwarna, sementara sperma mati akan terlihat berwarna merah karena menyerap pewarna.

$$Viabilitas = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{Total spermatozoa yang terhitung}} \times 100\%$$

Abnormalitas spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa dapat dibedakan menjadi abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Penentuan normalitas spermatozoam adalah perbandingan antara spermatozoa abnormal dan spermatozoa normal (Fitrik dan Supartini, 2012). Abnormalitas primer biasanya terjadi pada bagian kepala yang sifatnya genetik sedangkan untuk abnormalitas sekunder terjadi pada bagian ekor dan mudah dilihat pada saat pengujian motilitas dan pemeriksaan viabilitas (Arifiantini *et al.*, 2010).

$$Abnormalitas = \frac{\text{Jumlah spermatozoa yang hidup}}{\text{Total spermatozoa yang terhitung}} \times 100\%$$

Daya tahan hidup spermatozoa

Evaluasi daya tahan hidup spermatozoa terhadap variasi suhu dengan interval pengamatan setiap 8 jam. Selama pengamatan tersebut, akan dicatat kapan spermatozoa menjadi tidak aktif atau tidak bergerak. Selain itu, nilai rata-rata gerakan progresif spermatozoa akan dievaluasi dengan menggunakan bahan pengencer dan penyimpanan hingga 40% untuk menentukan dampaknya terhadap kualitas sperma.

$$DTH = \frac{A+B}{A-C} \times D + E$$

Keterangan; A; Motilitas di atas standar, B; Motilitas standar, C; Motilitas di bawah standar D; Rentang waktu pengamatan E; Jam penyimpanan dengan motilitas di atas standar.

Analisis Data

Hasil penelitian dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Jika terdapat perbedaan pada perlakuan, langkah selanjutnya adalah dilakukan uji lanjutan dengan uji. Duncan untuk membandingkan setiap perlakuan. Data dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS 29.0 for Windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas Spermatozoa Babi Landrace

Persentase motilitas adalah indikator dari aktivitas spermatozoa yang progresif dan memiliki korelasi yang sangat erat dengan tingkat fertilitas. (Pamungkas dan Anwar, 2013; Ndeta *et al.*, 2015) menyatakan bahwa kemampuan spermatozoa untuk bergerak aktif adalah faktor penentu utama dalam menilai kualitas spermatozoa yang berkaitan dengan tingkat fertilitas. Sifat morfologi dan metabolisme yang dimiliki oleh spermatozoa mampu bergerak maju ke depan dalam lingkungan cair. Penelitian motilitas spermatozoa dilakukan setiap delapan jam pengamatan hingga kualitas spermatozoa mencapai angka 40% dan layak untuk diinseminasi buatan (IB). Rata-rata nilai motilitas spermatozoa babi Landrace pada setiap perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Motilitas spermatozoa babi Landrace

Jam pengamatan	Perlakuan					Nilai P
	P0	P1	P2	P3	P4	
0	75,50±5,00 ^a	75,50±5,00 ^a	75,50±5,00 ^a	75,50±5,00 ^a	75,50±5,00 ^a	1,00
8	37,50±6,45 ^b	72,50±5,00 ^a	72,50±5,00 ^a	72,50±5,00 ^a	72,50±5,00 ^a	0,001
16	23,75±6,29 ^b	63,75±4,79 ^a	63,75±4,79 ^a	66,25±6,29 ^a	63,75±6,29 ^a	0,001
24	13,75±4,79 ^b	51,25±6,29 ^a	53,75±4,79 ^a	57,50±5,00 ^a	55,00±10,8 ^a	0,001
32	6,25±2,50 ^c	40,00±4,08 ^b	41,25±2,50 ^b	46,25±2,50 ^a	40,00±4,08 ^b	0,001
40	5,00±0,00 ^c	23,75±6,29 ^b	30,00±0,00 ^{ab}	35,00±0,00 ^a	35,00±10,00 ^b	0,001

Keterangan : ^{a,b,c}Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05), P0 = MIII100% P1= MIII 95% + 5% KTB, P2= MIII90% + 10%KTB, P3= MIII 85% + 15%KTB, P4= MIII 80% + 20%KTB

Dari tabel 1 terlihat bahwa penurunan nilai motilitas spermatozoa terjadi secara bertahap pada setiap perlakuan dengan meningkatnya waktu penyimpanan. Persentase motilitas pada jam ke-0 tidak berbeda nyata antar perlakuan (P>0,05), tetapi pada jam ke-8 hingga jam ke-32, terdapat perbedaan signifikan antar perlakuan (P<0,05). Penurunan motilitas umumnya disebabkan oleh berkurangnya zat-zat makanan yang tersedia bagi spermatozoa serta pengaruh zat toksik yang dihasilkan sebagai produk

sampingan metabolise. Penambahan berbagai level kuning telur bebek yang berbeda dalam pengencer MIII dapat mempertahankan serta melindungi motilitas spermatozoa babi Landrace. Ini disebabkan oleh kandungan fosfolipid, kolesterol, dan low density lipoprotein (LDL) dalam kuning telur bebek, yang berperan dalam melindungi membran plasma dan akrosom spermatozoa dari *cold shock* selama penyimpanan. Lipoprotein kuning telur, yang terdiri dari 85% lemak dan 15% protein, berfungsi

sebagai sumber energi dan pelindung ekstraseluler spermatozoa dari *cold shock* saat diencerkan. Glukosa dalam kuning telur juga memberikan efek penyangga terhadap spermatozoa dan sering digunakan untuk metabolisme dibandingkan dengan fruktosa yang terdapat dalam semem. (Trilaksana *et al.*, 2018).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada jam ke 32, motilitas spermatozoa dengan perlakuan P1, P2, P3, dan P4 dapat mempertahankan motilitas yang memenuhi standar untuk inseminasi buatan (IB), yaitu sekitar 40%. Rataan motilitas untuk masing masing perlakuan adalah P1 $40,00 \pm 4,08$, P2 $41,25 \pm 2,50$, P3 $46,25 \pm 2,50$, dan P4 $40,00 \pm 4,08$. Untuk P0 pada jam ke 32 menunjukkan nilai motilitas spermatozoa yang tidak nyata $P < 0,05$, sudah di bawah 40%. Hal tersebut dapat dijelaskan bahwa pada perlakuan P0 terjadi penurunan secara drastis karena dalam pengenceran hanya menggunakan bahan dasar saja dibandingkan dengan perlakuan lain sehingga P0 tidak dapat bertahan lama hingga 32 jam. Semakin lama penyimpanan, persentase motilitas individu cenderung menurun karena sumber energi spermatozoa berkurang dan kemungkinan terjadi akumulasi sisa hasil metabolisme, seperti asam laktat. Perbedaan hasil yang diperoleh dari berbagai penelitian dapat disebabkan oleh beberapa faktor, termasuk variasi suhu ruang, waktu pengamatan, jenis bahan pengencer yang digunakan, dan kondisi lingkungan yang berbeda.

Penurunan motilitas dari masing-masing perlakuan mulai rendah pada jam ke-8 hingga jam ke-32, yang diduga disebabkan oleh penyesuaian dengan lingkungan eksternal. Temuan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya oleh Johnson *et al.* (2000) dan Sumardani (2007), yang menyatakan bahwa penyesuaian bahan pengencer dan dampak cekaman dingin adalah faktor penting dalam menentukan motilitas spermatozoa selama penyimpanan *in vitro*. Penurunan

motilitas spermatozoa setelah penyimpanan yang lama terjadi karena penurunan zat-zat makanan yang mendukung sperma dan pengaruh zat toksik dari metabolisme sperma. Motilitas spermatozoa bergantung pada suplai energi, terutama ATP, yang dihasilkan dari metabolisme sel. Faktor lain yang dapat menyebabkan penurunan motilitas meliputi paparan suhu dingin dan peningkatan asam laktat.

Integritas membran plasma merupakan kondisi krusial untuk menjaga kelangsungan hidup, motilitas, dan kemampuan fertilisasi spermatozoa. Membran plasma berperan sebagai penghalang sel yang melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik serta mengatur transport zat makanan dan ion yang penting dalam metabolisme. Kerusakan pada membran plasma dapat mengganggu proses metabolik dan fisiologis, yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Rasul *et al.*, 2001). Protein dalam plasma semen babi yang dapat merusak lipid membran plasma sel juga berpotensi mempengaruhi kualitas semen, dengan tingkat kerusakan bergantung pada konsentrasi protein plasma tersebut (Bebas *et al.*, 2016). Nilai motilitas menunjukkan bahwa perlakuan P3 memiliki nilai motilitas di atas 46,25% pada jam penyimpanan ke 32 diikuti P2, P1, dan P4 dengan nilai standar 40%. Hal ini terjadi karena di dalam kuning telur bebek mengandung low density lipoprotein (LDL) yang bertugas melindungi membran sel dari kerusakan akibat plasma semen. Sementara itu, plasma semen babi yang mengandung protein dapat merusak lipid dalam membran plasma sel, yang dapat berdampak negatif pada kualitas semen tergantung pada konsentrasi protein plasma tersebut (Bebas *et al.*, 2016). Penelitian ini bertentangan dengan temuan Bebas dan Gorda (2016), yang menunjukkan bahwa pengencer dengan fosfat dari kuning telur bebek memberikan hasil yang lebih baik dalam hal motilitas progresif ($69,88 \pm 1,458$) selama 48 jam. Studi

tersebut juga menunjukkan tingkat integritas membran plasma yang tinggi dan rendahnya abnormalitas pada semen babi dibandingkan dengan pengencer fosfat dari kuning telur puyuh dan ayam kampung.

Penelitian Bebas dan Gorda (2016) menyajikan hasil berbeda, menunjukkan bahwa suspensi dari kuning telur bebek memberikan peningkatan signifikan dalam motilitas spermatozoa babi Landrace dibandingkan dengan kuning telur puyuh dan ayam. Selain itu, Ulu *et al.* (2022) menjelaskan bahwa kolesterol memegang peran penting dalam menjaga fluiditas spermatozoa, di mana kandungan kolesterol yang adekuat pada membran meningkatkan fluiditasnya, sedangkan kekurangan kolesterol dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa.

Viabilitas Spermatozoa Babi Landrace

Viabilitas spermatozoa adalah indikator daya hidup yang ditunjukkan

oleh keutuhan membran plasma. Spermatozoa yang masih hidup akan mempertahankan integritas membran, sehingga kepala sperma tidak menyerap warna (Tethool *et al.*, 2022). Sebaliknya, penelitian oleh Bebas *et al.* (2016) menunjukkan bahwa spermatozoa yang sudah mati akan berwarna merah, sementara yang masih hidup akan tampak transparan atau tidak berwarna. Evaluasi viabilitas spermatozoa dilakukan setiap 8 jam hingga mencapai tingkat kualitas sekitar 40%.

Hasil uji statistik viabilitas spermatozoa menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa pada jam ke-0 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$). Pada jam pengamatan ke-8 hingga ke-40, terdapat perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) pada jam pengamatan ke 40.

Tabel 2. Viabilitas spermatozoa babi Landrace

Jam pengamatan	Perlakuan					
	P0	P1	P2	P3	P4	Nilai P
0	89,00±4,60 ^a	88,68±4,99 ^a	90,11±4,10 ^a	90,11±4,03 ^a	89,75±3,29 ^a	0,988
8	53,85±4,33 ^b	79,75±5,64 ^a	79,95±6,14 ^a	84,12±4,89 ^a	81,15±3,55 ^a	0,001
16	37,51±7,36 ^b	69,64±4,76 ^a	70,39±5,11 ^a	75,49±5,60 ^a	67,36±12,77 ^a	0,001
24	28,25±3,48 ^b	59,41±5,75 ^a	61,27±6,01 ^a	64,86±4,10 ^a	59,94±7,92 ^a	0,001
32	17,76±4,89 ^b	48,77±6,44 ^a	51,18±5,58 ^a	56,60±4,54 ^a	51,51±7,70 ^a	0,001
40	11,22±2,13 ^c	36,13±4,55 ^b	40,18±2,12 ^{ab}	44,33±3,40 ^a	38,77±7,89 ^{ab}	0,001

Keterangan: ^{a,b,c}Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), P0 = MIII 100%, P1= MIII 95% + 5% KTB, P2= MIII 90% + 10% KTB, P3= MIII 85% + 15% KTB, P4= MIII 80% + 20% KTB

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pada perlakuan P3 15% KTB dicampurkan dalam pengencer sebanyak MIII 85%, mampu mempertahankan persentase hidup (viabilitas) hingga pada jam pengamatan ke-40 dengan rerata persentase $44,33 \pm 3,39$. Demikian dengan perlakuan P2 MIII 90%+10% KTB mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa hingga pada jam pengamatan ke-40 dengan persentase nilai sebesar $40,18 \pm 2,12$. Selain itu perlakuan ini dianggap layak untuk diinseminasi buatan (IB), karena mampu bertahan hingga 40%. Nilai viabilitas spermatozoa pada perlakuan P2 dan P3 hampir sama, karena dipengaruhi oleh ketersediaan energi dan nutrisi yang lebih lengkap sehingga dapat mempertahankan kehidupan spermatozoa (Dwatmadji *et al.*, 2007).

Pengencer MIII 85% + KTB + 15% memiliki komponen dalam jumlah yang lengkap dan cukup untuk mendukung kelangsungan hidup spermatozoa babi Landrace selama proses penyimpanan. Komponen-komponen seperti Bovine Serum Albumin (BSA) berperan dalam menjaga pH dan tekanan osmotik serta melindungi spermatozoa pada suhu dingin. Sementara itu, glisin bertindak sebagai sumber protein penting yang memberikan nutrisi bagi spermatozoa selama penyimpanan (Johnson *et al.*, 2000). Persentase viabilitas spermatozoa lebih rendah dalam bahan pengencer tersebut karena komponen-komponen yang diperlukan untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa babi Landrace selama proses penyimpanan pada suhu dingin tidak lengkap atau tidak mencukupi. Kekurangan ini berdampak pada penurunan viabilitas spermatozoa.

Bahan pengencer dari kuning telur bebek mengandung magnesium, sodium, fosfor, dan selenium per 100 gram, yang memainkan peran penting dalam melindungi spermatozoa dari *cold shock*. Selain itu, kolesterol yang terdapat dalam kuning telur bebek dianggap sebagai zat

yang paling efektif dalam melindungi spermatozoa dari kondisi dingin.

Lesitin (fosfatidilkolin) yang terdapat dalam kuning telur juga berfungsi sebagai komponen membran yang menjaga struktur utama membran sel spermatozoa (Bebas dan Gorda, 2016). Persentase viabilitas sperma tertinggi terjadi pada perlakuan P2 dan P3, sementara yang terendah terjadi pada perlakuan P0, P1, dan P4. Hal ini disebabkan oleh komposisi pengencer yang digunakan dalam masing-masing perlakuan, di mana perlakuan P0 menggunakan MIII 100% tanpa tambahan KTB, P1 menggunakan MIII 95% + 5% KTB, dan P4 menggunakan MIII 80% + 20% KTB. Penurunan persentase viabilitas spermatozoa yang lebih cepat pada perlakuan dengan tambahan kuning telur bebek (KTB) menunjukkan bahwa komponen-komponen pengencer yang diperlukan untuk mempertahankan kehidupan sperma belum mencukupi atau tidak lengkap. Hal ini menyebabkan penurunan integritas membran sperma dan kualitas sperma yang lebih rendah. Lamanya waktu penyimpanan dapat menyebabkan penurunan jumlah sperma dan penggunaan nutrisi sebagai sumber energi oleh sperma. Kurangnya nutrisi yang tersedia dapat menyebabkan penurunan viabilitas sperma. Menurut Tamoës *et al.* (2014), penurunan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan pada suhu dingin disebabkan oleh stress oksidatif. Pendapat ini diperkuat oleh Susilawati (2011), yang mengungkapkan bahwa proses pendinginan dapat menyebabkan stress fisik dan kimia pada membran sel, yang pada akhirnya dapat menurunkan viabilitas spermatozoa. Semakin lama waktu penyimpanan dapat menyebabkan penurunan pH semen. Kerusakan pada membran plasma spermatozoa dapat terjadi ketika protein dalam plasma semen bereaksi dengan lipid yang menyusun membran, mengakibatkan perubahan struktural yang merusak keintegritasan dan fungsi sperma.

Menurut Toelihere (1993), dalam penyimpanan spermatozoa babi Landrace, perbedaan viabilitas terhadap motilitas dapat terjadi karena beberapa spermatozoa tidak bergerak tetapi masih hidup, sementara spermatozoa yang bergerak pasti masih hidup. Gudogan *et al.* (2010) menjelaskan bahwa penurunan viabilitas spermatozoa dimulai dengan penurunan motilitas, diikuti oleh gangguan aktivitas metabolisme sel, kerusakan membran plasma, dan akhirnya menurunnya viabilitas spermatozoa sebagai hasil dari kerusakan tersebut. Dalam penelitian ini, semen dalam pengencer memenuhi kriteria kualitas untuk inseminasi buatan karena viabilitas spermatozoa setelah disimpan selama 40 jam tetap di atas 40%, seperti yang diungkapkan oleh Apriliana *et al.* (2021).

Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan dengan temuan yang dilaporkan oleh Bebas dan Gorda (2016), di mana semen babi yang diencerkan dengan kuning telur bebek selama 48 jam memiliki persentase viabilitas yang lebih tinggi, sekitar $82,25 \pm 2,062\%$, dibandingkan dengan kuning telur ayam yang sekitar $76,50 \pm 3,109\%$. Hal ini menunjukkan bahwa kuning telur bebek lebih efektif dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa dibandingkan dengan kuning telur ayam.

Abnormalitas Spermatozoa Babi Landrace

Menurut Afiati *et al.* (2015), abnormalitas spermatozoa adalah salah satu indikator penting dalam mengevaluasi kualitas spermatozoa karena struktur sel yang tidak normal dapat mengganggu proses fertilisasi. Penentuan abnormalitas ini dapat dilakukan secara bersamaan dengan perhitungan viabilitas spermatozoa. Persentase spermatozoa sangat penting untuk diketahui karena abnormalitas yang tinggi hingga 20% dari jumlah spermatozoa akan mengganggu daya fertilitas pejantan (Hidayati *et al.*, 2015). Jenis abnormalitas spermatozoa yang diamati pada penelitian ini adalah abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer dapat terjadi karena kegagalan yang disebabkan oleh faktor keturunan genetik. Sedangkan abnormalitas sekunder berupa spermatozoa, yang kepala terpisah dari ekor dan ekor yang melengkung atau putus. Abnormalitas sekunder dapat timbul karena kesalahan dalam proses preparasi atau ejakulasi. Dalam penelitian ini, mayoritas abnormalitas sekunder terjadi pada bagian ekor spermatozoa, mungkin disebabkan oleh tekanan selama proses pembuatan preparat atau paparan terhadap perubahan suhu yang tiba-tiba (*cold shock*).

Tabel 3. Abnormalitas spermatozoa babi Landrace

Jam pengamatan	Perlakuan (%)					Nilai P
	P0	P1	P2	P3	P4	
0	4,09±0,96	3,80±0,88	3,80±0,88	3,54±1,08	3,79±1,28	0,96
8	4,49±0,94	4,10±0,89	4,10±0,89	3,89±1,10	4,11±1,23	0,94
16	4,73±0,83	4,37±0,87	4,37±0,87	4,24±1,14	4,46±1,29	0,96
24	5,06±0,85	4,72±0,90	4,72±0,90	4,54±1,20	4,73±1,39	0,82
32	5,45±0,68	5,22±1,02	5,22±1,00	6,47±2,88	5,08±1,26	0,72
40	5,98±0,78	5,53±0,92	5,53±0,92	5,16±1,06	5,41±1,18	0,83

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dalam abnormalitas spermatozoa babi Landrace antara perlakuan yang menggunakan berbagai level kuning telur bebek dalam pengencer MIII. Meskipun

demikian, rata-rata abnormalitas mengalami peningkatan, dengan perlakuan P3 memiliki jumlah abnormalitas tertinggi ($6,47 \pm 2,88\%$), diikuti oleh P0 ($5,45 \pm 0,6\%$), dan yang terendah adalah perlakuan P1 dan P4.

Peningkatan abnormalitas spermatozoa seiring dengan bertambahnya lama penyimpanan dapat dikaitkan dengan penurunan kadar lipoprotein dalam kuning telur bebek. Penurunan ini menyebabkan fungsi perlindungan terhadap *cold shock* pada spermatozoa semakin menurun seiring berjalannya waktu. Hal ini juga didukung oleh temuan Solihati dan Kune (2009), yang menyatakan bahwa peningkatan abnormalitas spermatozoa dipengaruhi oleh lamanya waktu penyimpanan. Dalam penelitian ini, setiap perlakuan menghasilkan persentase abnormalitas spermatozoa yang masih berada dalam kisaran normal, yaitu kurang dari 20%. Selanjutnya, menurut Suyadi dan Iswanto (2012), peningkatan angka abnormalitas spermatozoa dapat terjadi selama proses pembuatan preparat. Semakin lama penyimpanan maka semakin tinggi nilai abnormalitas spermatozoa, hal ini disebabkan oleh kejutan dingin dan juga tidak seimbang tekanan osmotik dalam proses metabolisme berlangsung.

Semakin rendah persentase abnormalitas, semakin baik kualitas spermatozoa. Meskipun terjadi peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa babi Landrace hingga 32 jam, pengencer ini masih dianggap layak untuk inseminasi buatan karena persentase abnormalitasnya tetap di bawah 20%. Temuan ini konsisten dengan pernyataan Shipley dan Act (1999), yang menegaskan bahwa jumlah morfologi abnormal spermatozoa kurang dari 20% sesuai untuk inseminasi buatan. Selain itu, Waberski *et al.* (2019) menjelaskan bahwa selama proses penyimpanan, spermatozoa mengalami penuaan alami yang dapat mempengaruhi struktur dan fungsi mereka. Kerusakan pada membran plasma dapat menyebabkan peningkatan morfologi abnormal spermatozoa dan kematian sel spermatozoa. Hal serupa juga ditekankan oleh Pinart *et al.* (2022), yang menyoroti bahwa lama penyimpanan dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa, meningkatkan jumlah

spermatozoa abnormal, dan mengubah suasana sperma menjadi tidak isotonik, yang semuanya berdampak pada kematian spermatozoa.

Kerusakan membran terjadi pada bagian tengah atau midpiece spermatozoa, di mana terdapat mitokondria yang berperan dalam pembentukan energi, oksidasi asam lemak, dan siklus Krebs. Selama penyimpanan, terjadi peningkatan abnormalitas, terutama dalam bentuk abnormalitas sekunder seperti ekor yang melingkar atau terputus. Hal ini disebabkan oleh perbedaan osmosis saat pengenceran, *cold shock* saat pendinginan, dan proses preparasi sampel yang dapat menyebabkan putusnya ekor spermatozoa.

Meskipun demikian, penelitian ini menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa dari setiap perlakuan tetap dalam kisaran normal, yaitu kurang dari 20%. Dari data hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer MIII ditambah berbagai level kuning telur bebek mampu menjaga spermatozoa dan masih layak digunakan untuk inseminasi buatan. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer MIII ditambah berbagai level kuning telur bebek mampu menjaga spermatozoa hingga masih layak digunakan untuk inseminasi buatan.

Daya Tahan Hidup Spermatozoa Babi Landrace

Daya tahan hidup yang dimaksud adalah kemampuan spermatozoa untuk tetap bergerak secara progresif dalam kurun waktu tertentu setelah penyimpanan *in vitro*, seperti yang dijelaskan oleh Hine *et al.* (2014). Pengamatan daya tahan hidup spermatozoa dilakukan untuk mengetahui persentase spermatozoa yang tetap hidup dalam pengencer MIII dengan penambahan level kuning telur bebek yang berbeda. Hasil analisis menunjukkan adanya perbedaan signifikan dalam daya tahan hidup spermatozoa antar perlakuan ($P < 0,05$). Penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan kuning telur bebek dalam pengencer MIII berpengaruh

terhadap daya tahan hidup spermatozoa. Perlakuan P3 mampu mempertahankan daya tahan hidup spermatozoa hingga $36,33 \pm 2,52$ jam.

Tabel 5. Daya tahan hidup spermatozoa babi Landrace

Perlakuan	Daya Tahan Hidup (Jam)
P0	$11,41 \pm 4,82^c$
P1	$32,00 \pm 3,26^b$
P2	$32,66 \pm 1,33^b$
P3	$36,33 \pm 2,52^a$
P4	$31,33 \pm 3,35^b$
Nilai P	$P < 0,05$

Keterangan: ^{a,b,c}Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$), P0 = MIII 100%, P1= MIII 95% + 5% KTB, P2= MIII 90% + 10% KTB, P3= MIII 85% + 15% KTB, P4= MIII 80% + 20% KTB

Hal ini menunjukkan bahwa penambahan kuning telur bebek dalam pengencer MIII memiliki nilai daya tahan hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P0, P1, P2, dan P4, yang memiliki daya tahan hidup lebih rendah. Daya tahan hidup berhubungan erat dengan nilai motilitas; jika nilai motilitas tinggi, maka daya tahan hidup juga tinggi, dan sebaliknya, jika nilai motilitas rendah, maka daya tahan hidup juga rendah. Daya tahan hidup spermatozoa dapat bertahan lama karena pada penyimpanan suhu rendah, proses metabolisme tidak terlalu banyak. Selain itu, spermatozoa yang hidup disebabkan oleh adanya plasma semen atau pengencer yang masih menyediakan energi, menjaga kestabilan elektrolit, tekanan osmotik, dan daya tahan spermatozoa itu sendiri. Oleh karena itu, sangat penting untuk menambahkan bahan pengencer, karena bahan pengencer berperan sebagai sumber energi, buffer, dan mampu mempertahankan pH semen (Toelihere, 1993).

Penurunan daya tahan hidup spermatozoa dipengaruhi oleh metabolisme yang menghasilkan produk

samping berupa asam laktat. Semakin banyak fruktosa yang dimetabolisme, semakin banyak asam laktat yang dihasilkan. Peningkatan kadar asam laktat ini dapat mengganggu proses metabolisme dengan meningkatkan peroksidasi lipid membran spermatozoa dan permeabilitas membran sel, yang akhirnya menyebabkan kerusakan dan kematian sel dengan cepat, sesuai dengan penjelasan Zakir (2010). Hal ini didukung oleh Salasa (2011), yang menyatakan bahwa semakin lama penyimpanan, semakin tinggi tingkat pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS) oleh spermatozoa. Akumulasi ROS dalam suspensi spermatozoa dapat terjadi, dan jika kenaikan ROS melebihi nilai normal, antioksidan yang ada pada spermatozoa dan pengencer tidak mampu menetralkannya. Hal ini dapat menyebabkan peroksidasi lipid dan kematian cepat pada membran spermatozoa. Sugiarto *et al.* (2014) juga menyatakan bahwa daya hidup spermatozoa sangat bergantung pada keutuhan membran, karena kerusakan pada membran spermatozoa dapat mengganggu proses metabolisme intraseluler, menyebabkan penurunan kualitas dan bahkan kematian spermatozoa.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan 15% kuning telur bebek dalam pengencer MIII yang digunakan sebanyak 85% merupakan level terbaik untuk mempertahankan kualitas semen cair babi Landrace hingga jam ke32. Hasilnya menunjukkan nilai motilitas spermatozoa sebesar $46,25 \pm 2,50\%$, viabilitas spermatozoa sebesar $44,33 \pm 3,40\%$, abnormalitas spermatozoa sebesar $6,47 \pm 2,88\%$, dan daya tahan hidup sebesar $36,33 \pm 2,52$ jam.

DAFTAR PUSTAKA

Afiati F. Yulnawati, Riyadi M, Arifiantini RI. 2015. Abnormalitas spermatozoa

- domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1(4): 930-934.
- Apriliana, K. S., Bebas, W., dan Trilaksana, I. G. N. B. (2021). Mempertahankan Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Babi dalam Pengencer Air Kelapa Kuning Telur Bebek dengan Pengimbuhan Sari Wortel. *Indonesia Medicus Veterinus*, 10(3), 409–419.
- Arifiantini RI dan B Purwantara. 2010. Motility and viability of friesian holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *Journal of the Indonesia Tropical Animal*, 35(4): 222-226.
- Arifiantini RI. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen. IPB Press, Bogor.
- Azzahra, F.Y., E.T. Setiatin dan D. Samsudewa. 2016. Evaluasi Motilitas dan Pesentase Hidup Semen Segar Sapi PO Kebumen Pejantan Muda. *Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Semarang. Jurnal Sains Peternakan Indonesia*, (2):99-107.
- Bebas W, Gorda W. 2016. Penambahan Astaxanthin pada Pengencer Kuning Telur Berbagai Jenis Unggas Dapat Memproteksi Semen Babi Selama Penyimpanan. *Jurnal Veteriner*, 17(4): 484-491.
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233.
- Departemen Kesehatan RI, 2004. Keluarga Sadar Gizi (KADARZI). Jakarta. Available from: <http://www.gizi.net/kebijakan-gizi/> [Accesed 4 Januari 2024].
- Dwatmadji D, Siwitri K, Edi S, dan Yanti F. 2007. Pengaruh Pengencer Kuning Telur Dengan Air Kelapa dan Lama Penyimpanan Terhadap Kualitas Semen Kambing Nubian. *JSPI*, 2(2): 22-28.
- Fitrik, Supartini N., 2012. Pengaruh suhu dan lama thawing terhadap kualitas spermatozoa kambing Peranakan Etawa. *Buana Sains*. 12: 81-866.
- Gadea, J. 2003. Pig Industry-Semen Extenders Used in the Artificial Insemination of Swine. A Review. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1 (27):17-27
- Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F., & Fidan, A. F. 2010. Influence of sperm concentration on the motily, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122(3), 200-207.
- Hidayati N, Arifiantini RI, Sajuthi D. 2015. Preservasi Semen Kambing Peranakan Ettawah Dalam Pengencer Tris dan Sitrat Kuning Telur Dengan Penambahan Sodium Dodecyl Sulphate. *Jurnal Veteriner*, 16 (3): 334-342.
- Hine T.M., Burhanudin, Marawali A. 2014. Efektivitas Air Buah Lontar Dalam Mempertahankan Motilitas, Viablitas, Dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi Bali. *Junal veteriner*, 15(2) : 263-273.
- Ihsan, M.N. 2010. Indeks fertilitas sapi PO dan persilangannya dengan Limousin. *J. Ternak Tropika*, 11(2): 82-87.

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of Boar Semen. *Journal Animals Reproduction Science* 62: 143-172.
- Nalley Wm, Handarini R, Purwanta B. 2007. Viabilitas spermatozoa rusa Timor (*Cervus timorensis*) di dalam pengencer tris kuning telur dengan sumber karbohidrat yang berbeda yang disimpan pada suhu ruang. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 12(4): 311-317.
- Ndeta AK, Uly K, Belli HLL. 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): 117-128.
- Nur, N. E., Nursamsi., Darmawati., Yusuf, M. 2023. Pengaruh Pengencer Tris Kuning Telur Itik Terhadap Kualitas Semen Sapi Bali dengan Konsentrasi Spermatozoa Berbeda. *Jurnal Agrokompleks Tolis*, 3(2): 53-59.
- Pamungkas, F. A. dan Anwar. 2013. Daya tahan hidup spermatozoa kambing Boer dalam pengencer tris kuning telur yang disimpan pada temperatur berbeda. *Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 1(12): 331 – 339.
- Pinart, E., Cenariu, M., Risopatrón, J., & Waberski, D. 2022. Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status.
- Rasul, Z., N. Ahmad, and M. Anzar. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl*, 22:278-283.
- Salasa, A. 2011. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Domba Dalam Beberapa Bahan Pengencer Terhadap Reaksi Kapasitas Dan Akrosom Spermatozoa Domba [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Shiple, C. F., & Act, D. (1999). Breeding soundness examination of the boar PRODUCTION TOOL. In *Swine Health and Production* (Vol. 7, Issue 3).
- Siregar FK. 2018. Pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen sapi pesisir sebelum proses pembekuan. Skripsi. Fakultas Peternakan Andalas Padang.
- Solihati Idi NR, Kune P. 2009. Pengaruh jenis pengencer terhadap motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa semen cair sapi simental. Makalah seminar nasional.
- Sugiarto, N., Susilawati, T., dan Wahyuningsih, S. 2014. Kualitas Semen Cair Sapi Limousin Selama Pendinginan Menggunakan Pengencer CEP-2 dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi Sari Kedelai. *Journal of Tropical Animal Production*, 15(1), 51–58.
- Sukmawati, E., Arifiantini, R. I., dan Purwantara, B. 2014. Freezing Capacity of Sperm on Various Type of Superior Bulls. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 19(3), 168–175
- Sumardani, N. L. G. 2007. Viabilitas dan Fertilitas Spermatozoa dalam Modifikasi Pengencer BTS dan Zorlesco dengan penyimpanan Berbeda dalam Rangkaian Inseminasi Buatan pada Babi. Tesis. Sekolah Pasca Serjana Institut Pertanian Bogor: Bogor.

- Susilawati TRD, Isnaini N, Kuswati K, dan Yekti AP. 2018. Character Of Liquid Semen Motility In Various Diluent On The Quality Of Indonesian Cattle. *Asian Journal Of Microbiology, Biotechnology And Environmental Sciences*, 20(1): 166-172.
- Suyadi, A. Rachmawati, N. Iswanto. 2012. Pengaruh α -Tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethanekuning Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 50C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*. 22 (3): 1-8.
- Tamoos, J. A., Nalley, W. M., & Hine, D. T. M. (2014). Fertilitas Spermatozoa Babi Landrace dalam Pengencer Modifikasi Zorlesco dengan Susu Kacang Kedelai. *Maret*, 12(1), 20–30.
- Tethool, A. N., Ciptadi, G., Wahjuningsih, S., Susilawati, T. 2022. Karakteristik dan Jenis Pengencer Semen Sapi Bali. *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis*. 12(1): 45-57.
- Toilihere, M.R. 1977. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Penerbit Angkasa Bandung. Bandung.
- Trilaksana GNB, Bebas W, Widiastuti W. 2018. Penggunaan Berbagai Kuning Telur Sebagai Bahan Pengencer terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Ayam Pelung. *Indonesia Medicus Veterinus*, 7 (3): 252-261.
- Ulu KF, Belli HLL, Riwu AR, Hine TM. 2022. Pengaruh Penggunaan Tiga Jenis Kuning Telur dalam Pengencer Air Kelapa Muda terhadap Kualitas Semen Sapi Bali. *Jurnal Nukleus Peternakan*. Hal, 7-8.
- Yulianti ER. 2006. Pengaruh beberapa pengencer dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda terhadap kualitas semen kambing boer sebelum pembekuan. Skripsi. Fakultas Peternakan UB Malang.
- Zakir, M.I. 2010. Pengaruh perbandingan Semen Dengan Pengencer Campuran Sari Kacang Hijau – Sitrat Dan Lama Penyimpanan Terhadap Daya Hidup Spermatozoa Kambing Kacang (*capra hircus*). *ZIRAA'AH*, Vol. 28(2): 156-161.
- Zhou, J.B., Yuek K.Z., Luo M.J., Chang Z.L., Liang H., Wang Z., Tan J.H. 2004, Effect of extender and temperatures on sperm viability and fertility capacity of harbin white boar semen during longterm liquid storage. *J Asian-Aus Anim. Sci.*17(11): 1501-1.