

## Pengaruh Penambahan Vitamin E Komersil pada Pengencer Andromed terhadap Kualitas Spermatozoa Pre-freezing Sapi Simental

### *Effect of Commercial Addition of Vitamin E to Andromed Diluent on Pre-Freezing Spermatozoa Quality of Simmental Cattle*

Yuni Sartika<sup>1\*</sup>, Muh. Basir Paly<sup>2</sup>, Rasyidah Mappanganro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Jurusan Ilmu Peternakan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

<sup>2</sup>Jurusan Ilmu Peternakan, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar  
Jalan H. Yasin Limpo No. 36, Romang Polong, Kabupaten Gowa, 92118

\*Email: unhii.sartika05@gmail.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan vitamin E komersil pada pengencer andromed terhadap kualitas spermatozoa pre-freezing sapi Simental. Metode penelitian menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 5 kali ulangan yaitu P0 (kontrol), P1 (+ vitamin E 1 mg/ml) dan P2 (+ vitamin E 3 mg/ml). Parameter yang diukur yaitu secara makroskopis (motilitas, viabilitas dan abnormalitas) pada saat *pre-freezing*. Hasil penelitian ini menunjukkan pengaruh yang berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap motilitas dan viabilitas dari spermatozoa fase *pre-freezing* dan menunjukkan pengaruh tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap *abnormalitas* spermatozoa fase *pre-freezing*.

Kata Kunci: Kualitas Spermatozoa, *Pre-freezing*, Vitamin E.

#### ABSTRACT

*This study aimed to determine the effect of addition of vitamin E commercial in andromed diluent on the pre-freezing spermatozoa quality in simmental cattle. The research method used a completely randomized design (CRD) method with 3 treatments and 5 replications, namely P0 (control), P1 (+ vitamin E 1 mg/ml) and P2 (+ vitamin E 3 mg/ml). Parameters measured were macroscopically (motility, viability and abnormality) at the time of pre-freezing. The results of this study showed a very significant effect ( $P < 0.01$ ) on the motility and viability of spermatozoa in the pre-freezing phase and showed no significant effect ( $P > 0.05$ ) on the abnormality of spermatozoa in the pre-freezing.*

*Keywords: Pre-freezing, Spermatozoa Quality, Vitamin E.*

#### PENDAHULUAN

Kebutuhan terhadap protein hewani masyarakat semakin meningkat seiring bertambahnya penduduk. Pertambahan penduduk ini sejalan dengan meningkatnya taraf hidup masyarakat disertai keadaan pentingnya nilai gizi kebutuhan tubuh dalam proses pertumbuhan, maka kebutuhan masyarakat terhadap protein hewani pun akan terus bertambah. Permintaan daging yang terus meningkat tidak diimbangi dengan meningkatkan produktivitas ternak sapi. Tingkat produksi daging sapi khususnya di Sulawesi Selatan menurun yakni dari tahun 2018 tercatat sebesar 110.827,08 ton, kemudian pada tahun 2019 tercatat 84.171,13 ton, lalu pada tahun 2020 tingkat produksi daging sapi menurun hingga 78.878,60 ton (BPS, 2021). Dalam hal ini melalui kebijakan pemerintah, untuk memenuhi kebutuhan dan persediaan daging sapi dilakukan dengan cara impor.

Upaya untuk memenuhi kebutuhan protein hewani masyarakat dapat dilakukan dengan cara meningkatkan produksi ternak penghasil daging. Maka, pemerintah berusaha meningkatkan populasi dan produksi serta memperbaiki kualitas genetik ternak. Dalam menanggulangi masalah ini dibutuhkan teknologi tepat yang bisa diterapkan secara mudah dan efisien. Upaya untuk mendorong peningkatan produksi dapat dilakukan melalui perbaikan teknologi produksi untuk meningkatkan produktivitas. Salah satu upaya meningkatkan populasi sapi yaitu dengan metode Inseminasi Buatan (IB) yang dilakukan

dengan cara menyilangkan sapi betina dengan semen pejantan. Metode inseminasi buatan merupakan metode perkawinan yang lebih efektif dan efisien dalam hal penggunaan semen beku untuk meningkatkan sapi persilangan dari pada perkawinan alami. Metode ini dilakukan dengan cara memasukkan *insemination gun* yang berisi semen pejantan ke dalam organ reproduksi sapi betina.

Tingkat keberhasilan perkawinan dengan IB sangat dipengaruhi oleh kualitas spermatozoa. Kualitas sperma sesudah penampungan akan mengalami penurunan apabila tidak dilakukan penanganan lanjut dengan cepat. Spermatozoa yang tidak diencerkan fertilitasnya akan menurun. Oleh karena itu untuk mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan dan pembekuan adalah dengan penambahan bahan pengencer pada semen yang telah ditampung.

Komposisi bahan pengencer yang digunakan untuk kriopreservasi semen diharapkan mampu melindungi spermatozoa dari kejutan dingin, mempertahankan motilitas dan kemampuan fertilitas spermatozoa, serta menjaga kestabilan membran plasma dan ketersediaan substrat energi untuk spermatozoa. Hal ini penting untuk mengurangi efek negatif perubahan pH dan osmolaritas, mencegah pertumbuhan bakteri, dan melindungi sel-sel spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh proses pendinginan, pembekuan, dan pencairan kembali (*thawing*) (Futino *et al.*, 2010).

Sebagai salah satu pengencer yang tidak mengandung kuning telur, Andromed sangat tepat digunakan karena tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme yang berasal dari telur. Sumber lesitin pengencer andromed bersumber dari ekstrak kacang kedelai, yang juga dapat menjalankan fungsi seperti pada lesitin kuning telur. Andromed mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lesitin, dan gliserilfosforil kolin (GPC) (Susilawati, 2011).

Pembekuan adalah suatu proses untuk menghentikan aktifitas sperma agar daya hidup sperma dapat diperpanjang sampai batas waktu yang lama. Suatu larutan dibekukan maka pelarut air membeku menjadi kristal es dan bahan terlarut tidak bersatu dengan kristal tersebut melainkan berakumulasi dan makin tepat. Dua faktor utama selama proses kriopreservasi sel spermatozoa yang dapat menurunkan viabilitas sel, yaitu kejutan dingin (*cold shock*) dan perubahan intaseluler akibat pengeluaran air yang bertalian dengan pembentukan kristal es (Yendraliza dkk., 2015).

*Pre-freezing* adalah salah satu tahapan proses pembekuan. Proses dalam *pre-freezing* dilakukan dengan cara meletakkan *straw* pada uap nitrogen (N<sub>2</sub>) cair, dengan menggunakan *box styrofoam* yang berukuran panjang x lebar x tinggi masing-masing 60 x 40 x 30 cm dengan suhu -110°C sampai dengan -120°C selama 9 menit. Suhu tersebut diperoleh jika *straw* yang disusun di atas rak yang ditempatkan kurang lebih 4 cm di atas permukaan N<sub>2</sub> cair. Tujuan utamanya sebagai proses adaptasi semen untuk tahap selanjutnya, agar tidak terjadi temperatur *shock*, yang dapat mengakibatkan abnormalitas atau kematian spermatozoa di dalam semen. Setelah pembekuan, semen beku disimpan di dalam *storage* kontainer yang berisi N<sub>2</sub> cair -196°C (Matahine, 2014).

Selama proses penyimpanan pada suhu dingin, semen akan mengalami peristiwa kejutan dingin (*cold shock*) dan serangan radikal bebas. Kejutan dingin (*cold shock*) dan radikal bebas dapat mengakibatkan penurunan terhadap kualitas semen berupa penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Metabolisme spermatozoa selama proses penyimpanan akan menghasilkan ROS (*Reactive Oksigen Spesies*) atau radikal bebas yang dampaknya merusak asam lemak tak jenuh pada membran spermatozoa sehingga berpengaruh terhadap motilitas dan kehidupan spermatozoa (Rizal dkk., 2010). Untuk meminimalkan kerusakan sel spermatozoa akibat dari kejutan dingin (*cold shock*) tersebut maka dapat ditambahkan antioksidan ke dalam pengencer (Bebas dkk., 2016).

Vitamin E (*α-tokoferol*) merupakan salah satu vitamin yang bersifat sebagai antioksidan yang larut dalam lemak yang mampu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai (Suryohudoyo, 1995). Vitamin E (*α-tokoferol*) merupakan antioksidan yang larut dalam lemak yang dapat menghentikan lipid peroksida membran plasma selama proses pendinginan (Breininger *et al.*, 2005). Vitamin E berfungsi sebagai antioksidan intraseluler yang paling kuat dalam mencegah peroksidasi asam

lemak tak jenuh di dalam dan di dinding sel, sehingga dapat menghindari kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap viabilitas dan fertilitas spermatozoa (Donnelly *et al.*, 1999; Agarwall *et al.*, 2004).

Vitamin E mempunyai kemampuan memutus rantai reaksi peroksidasi atau menangkap radikal bebas dengan cara bereaksi secara langsung dengan berbagai radikal peroksi organik sehingga mencegah terjadinya reaksi berantai dan dapat menekan terjadinya kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap kualitas semen (Bebas dkk., 2016).

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan Penelitian

Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semen segar yang berasal pejantan sapi Simental yang dipelihara di UPT-PIBPS Provinsi Sulawesi Selatan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar 1 ml (untuk masing-masing perlakuan), vitamin E 20 ml (untuk keseluruhan pada perlakuan yang digunakan), zat pewarna (eosin-negrosin), Andromed, alkohol 70%, air dan vaseline. Alat-alat yang akan digunakan adalah vagina buatan dan perangkatnya, kandang jepit, termometer, gelas ukur, *stopwatch*, *warmplate*, pH meter, *photometer*, *straw*, *tissue*, inkubator, mikroskop, gunting, *cover glass*, *deck glass*, pipet tetes, tabung reaksi, corong, ember, pinset dan *aluminium foil*.

### Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan metode eksperimen yaitu metode yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali.

### Parameter

Parameter kualitas spermatozoa yang diukur yaitu secara mikroskopis (motilitas, abnormalitas dan viabilitas) pada saat *pre-freezing*.

### Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 3 perlakuan dan 5 kali pengulangan. spermatozoa yang memiliki nilai makroskopis dan mikroskopis baik dengan motilitas 60% diproses lebih lanjut yaitu pengenceran Andromed dan diberi perlakuan dengan penambahan Vitamin E sebagai berikut:

P0: Perlakuan Tanpa Vitamin E

P1: Perlakuan Dengan Penambahan Vitamin E 1 mg/ml

P2: Perlakuan Dengan Penambahan Vitamin E 3 mg/m

### Prosedur Penelitian

#### *Pemeliharaan Sapi Simental*

Proses pemeliharaan sapi Simental dikandangan secara individu. Kandang dibersihkan pada pagi hari dan sore hari, kegiatan pembersihan kandang meliputi pembersihan kotoran ternak (feses), pemberian pakan dan air minum serta lorong pada kandang. Kotoran atau feses ternak sebagian besar ditaburkan ke ladang penghijauan sisanya dialirkan ke saluran drainase. Selanjutnya kotoran yang menempel pada bagian tubuh ternak dibersihkan dengan cara menyemprot dan menyikat tubuh ternak mulai dari bagian kaki/kuku ternak hingga badan ternak. Kemudian dinding kandang dibersihkan menggunakan sikat atau pel karet. Setelah kandang dan ternak bersih dari kotoran maka peralatan yang digunakan juga perlu dibersihkan. Setelah pembersihan kandang maka selanjutnya adalah pemberian touge sebanyak 2 kg, konsentrat sebanyak 2 kg dilanjutkan pemberian hijauan sebanyak 10 kg/ekor. Pemberian touge hanya dilakukan dalam 1 kali sehari, yaitu pada pagi hari pukul 07.00. Sedangkan hijauan dan konsentrat pada pukul 07.15 dan pukul 16.00 WITA.

#### *Persiapan Penampungan Semen*

Sebelum dilakukan penampungan sapi terlebih dahulu dimandikan dan diberi pakan seperti hari biasa. Tujuan dimandikan untuk menghindari terjadinya kontaminasi penis dengan kotoran, khususnya pada bagian perut bawah. Vagina buatan yang telah disiapkan dilengkapi dengan termometer, vaselin, air panas dan pemompa. Penampungan semen dilakukan di pagi hari. Adapun prosedur penampungan semen segar yaitu sebagai berikut:

- a. Menyiapkan *teaser* pada kandang jepit yang telah dirancang.
- b. Mendekatkan pejantan yang akan ditampung pada *teaser*. Biarkan pejantan menaiki *teaser* minimal 2 kali untuk menaikkan libidonya.
- c. Melakukan penampungan semen.
- d. Setelah pejantan ejakulasi pada vagina buatan, kemudian ditegakkan dan digerakkan membentuk angka delapan.

#### **Evaluasi Semen**

##### **a. Pre-freezing**

- 1) Pada setiap straw yang diberikan perlakuan disimpan di *cool box* dengan berisikan N<sub>2</sub> cair selama 15 menit
- 2) Setelah 4 jam dilakukan evaluasi motilitas dibawah mikroskop dengan menggunakan objek glass dan cover glass
- 3) Pemeriksaan viabilitas dilakukan dengan menambahkan zat pewarna dan semen beku dengan perbandingan 4:1.
- 4) Pemeriksaan abnormalitas dilakukan dengan menambahkan zat pewarna dan semen beku dengan perbandingan 4:1. Spermatozoa yang abnormal dihitung apabila ekornya bengkok, kepala dan ekor terputus.

#### **Proses Pembuatan Larutan Pengencer**

Pengenceran dilakukan dalam tabung reaksi yang steril. Pengencer utama yang digunakan adalah Andromed. Lalu diencerkan dengan aquabidest dengan perbandingan 1:4. Jumlah Andromed yang digunakan diketahui dengan menggunakan alat *Photometer*. Jika volume semen sebanyak 5 mL maka pengencer Andromed yang digunakan sebanyak 30 mL (6 ml Andromed/1 ml semen). Semen yang telah diperiksa secara makroskopik dan mikroskopik dipisahkan menjadi 4 bagian yaitu Perlakuan 1 (P0) sebanyak 1 ml semen sebagai kontrol ditambahkan Andromed (tanpa vitamin E), Perlakuan 2 (P1) sebanyak 1 ml semen ditambahkan Andromed dan Vitamin E 1mg/ml dan Perlakuan 3 (P2) sebanyak 1 ml semen ditambahkan Andromed dan Vitamin E 3 mg/ml.

Cara pengenceran yaitu dengan memasukkan bahan pengencer ke dalam tabung reaksi yang berisi semen melalui dinding tabung dengan cara memutar tabung reaksi. Agar larutan homogen maka dilakukan pencampuran dengan cara membolak-balikkan tabung reaksi secara perlahan-lahan.

##### **1. Printing**

*Straw* di *printing* dan semen yang telah ditambahkan pengencer dimasukkan ke alat *filling* dan *sealing*. Mesin ini secara otomatis memasukkan dosis semen sebanyak 0,25 cc kedalam *straw* yang telah diberi label berupa informasi pejantan dan tempat diproduksinya.

##### **2. Ekuilibrasasi**

Ekuilibrasasi adalah proses yang diperlukan spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan pengencer, sehingga pada waktu pembekuan, kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dihindari.

##### **3. Freezing**

Tahap ini diawali dengan *pre-freezing* yaitu *straw* diletakkan di uap N<sub>2</sub> cair pada suhu -70°C selama 10-15 menit. Kemudian tahap *freezing* dengan meletakkan *straw* ke dalam N<sub>2</sub> cair dengan suhu -196°C.

##### **4. Pemeriksaan Post Thawing Motility**

Pemeriksaan setelah *thawing straw* yang sudah dibekukan dan disimpan di kontainer selama 12 jam kemudian dikeluarkan dari kontainer, lalu dilakukan *thawing* selama ± 1 menit pada suhu 37°C. Setelah itu, *straw* digunting pada bagian ujung atas dan bawah untuk mengeluarkan semen dan diletakkan pada *object glass* dan dilakukan pemeriksaan motilitas, viabilitas, konsentrasi dan abnormalitas.

#### **Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis dengan analisis variance (ANOVA) satu arah, apabila ada pengaruh dilanjutkan dengan uji Duncan. Analisis Duncan ini digunakan untuk mengetahui dimana letak perbedaan pengaruh tersebut dengan penambahan Vitamin E yg lebih kuat pengaruhnya terhadap kualitas sperma.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas pada saat ekuilibrase, *pre-freezing* dan *post thawing* terhadap ke-3 perlakuan, yaitu: P0 (kontrol), P1 (1 mg/ml vitamin E) dan P2 (3 mg/ml vitamin E) memberikan hasil yang berpengaruh nyata ( $P < 0,01$ ). Dengan hasil yang diperoleh motilitas pada saat ekuilibrase yakni P0 ( $60,00 \pm 0,00$ ), P1 ( $56,00 \pm 5,48$ ) dan P2 ( $36,00 \pm 11,40$ ). Kemudian pada saat *pre-freezing* didapatkan hasil yakni P0 ( $48,00 \pm 4,47$ ), P1 ( $41,00 \pm 23,56$ ) dan P2 ( $27,00 \pm 14,83$ ). Dan pada saat *post thawing* diperoleh hasil yaitu P0 ( $50,00 \pm 0,00$ ), P1 ( $30,00 \pm 21,51$ ) dan P2 ( $9,00 \pm 6,52$ ).

Tabel 1. Rataan persentase motilitas *pre-freezing* semen sapi simental dengan penambahan vitamin E.

Variabel	Perlakuan			Nilai P
	P0	P1	P2	
<i>Pre-freezing</i>	$48,00 \pm 4,47^a$	$41,00 \pm 23,56^{a,b}$	$27,00 \pm 14,83^{b,c}$	$P < 0,01$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perlakuan berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ).

Nilai rata-rata motilitas terendah semen beku pada saat *pre-freezing* ditunjukkan pada perlakuan P2 dengan nilai motilitas 27,00% dan motilitas tertinggi ditunjukkan pada perlakuan P0 dengan motilitas 48%. Penurunan motilitas diduga terjadi karena vitamin E yang digunakan berbentuk bubuk sehingga membatasi pergerakan spermatozoa. Hal ini sesuai dengan penelitian Syafrizal (2015), bahwa penambahan vitamin E mengalami penurunan motilitas diakibatkan oleh vitamin E yang digunakan berbentuk powder atau bubuk yang tidak larut dalam pengencer andromed dikarenakan masih menyisakan partikel-partikel bulat pada saat pengamatan dibawah mikroskop yang menghambat laju spermatozoa. Semakin banyak ditambahkan vitamin E maka semakin rendah motilitasnya. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian dari Astrini dkk (2017), bahwa penambahan *Alfa tokoferol* (vitamin E) ke dalam pengencer CEP-D memberikan pengaruh yang berbeda nyata, hal ini ditunjukkan oleh dosis alfa tokoferol 3 mM yang merupakan dosis terbaik dalam menghasilkan persentase motilitas spermatozoa yaitu sebesar 74,38%, berbeda dengan perlakuan 0 mM yang menghasilkan persentase motilitas spermatozoa terkecil yaitu sebesar 70%.

Tabel 2. Rataan persentase viabilitas *pre-freezing* semen sapi simental dengan penambahan vitamin E.

Variabel	Perlakuan			Nilai P
	P0	P1	P2	
<i>Pre-freezing</i>	$73,99 \pm 8,11^b$	$78,91 \pm 12,07^b$	$38,62 \pm 26,56^a$	$P < 0,01$

Keterangan: Superskrip atau notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ).

Nilai rata-rata viabilitas terendah semen beku saat *pre-freezing* ditunjukkan pada perlakuan P2 dengan nilai viabilitas 38,62% dan viabilitas tertinggi ditunjukkan pada perlakuan P1 dengan viabilitas 78,91%. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada konsentrasi *Tocopherol* 1 mg/ml dalam pengencer dapat mempertahankan terhadap penurunan persentase viabilitas spermatozoa. Hal ini sesuai dengan penelitian dari Hartono (2008), bahwa perlakuan berpengaruh sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap persentase spermatozoa hidup, persentase tertinggi terlihat pada penambahan 0,4 g vitamin E yaitu 87,70% dan terendah pada penambahan 0,2 g vitamin E yaitu 82,27%. Karena setelah processing semen, viabilitas spermatozoa mengalami penurunan. Hal ini disebabkan oleh spermatozoa yang mengalami stress oksidatif selama penyimpanan suhu dingin. Proses pendinginan mengakibatkan stress fisik dan kimia pada

membran spermatozoa maka dibutuhkan. Untuk menghentikan stress oksidatif tersebut dibutuhkan antioksidan yang mempunyai kemampuan memutus reaksi berantai yaitu *a-tocopherol* atau vitamin E (Suyadi, 2012).

Tabel 3. Rataan persentase abnormalitas pada *pre-freezing* semen sapi simental dengan penambahan vitamin E.

Variabel	Perlakuan			Nilai P
	P0	P1	P2	
Pre-freezing	63,61±24,79	68,49±3,65	66,29±15,15	P>0,05

Keterangan: Superskrip atau notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P>0,05).

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemberian vitamin E tidak berpengaruh nyata (P>0,05) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa sapi simental. Hal ini tidak sesuai dengan hasil penelitian dari Iswanto dkk (2013), bahwa penambahan *Tocopherol* yang berbeda dalam pengencer *Tris Aminomethane* kuning telur mampu mempertahankan (P 0,01) terhadap peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa.

Peningkatan angka abnormalitas diduga disebabkan pada saat pembuatan preparat sebelum dilakukan pengamatan. Dimana pada saat pembuatan preparat apus peneliti menekan kaca preparat dengan kuat sehingga menyebabkan terpisahnya kepala dan ekor pada spermatozoa. Sesuai pernyataan Rizal dan Herdis (2006), bahwa abnormalitas lebih banyak berupa terpisahnya ekor dengan kepala akibat terputus saat pembuatan preparat sebelum dilakukan pengamatan. Avida (2009), menyatakan bahwa perubahan suhu selama prosesing semen dapat menyebabkan perubahan permeabilitas sel membran sel dinding spermatozoa, keadaan tersebut dapat menyebabkan meningkatnya abnormalitas spermatozoa.

### KESIMPULAN

Penambahan vitamin E pada pengencer memberikan pengaruh nyata pada saat *Pre-Freezing* terhadap motilitas spermatozoa, dimana nilai dari P<0,01. Dalam penambahan vitamin E pada pengencer memberikan pengaruh nyata pada saat *Pre-Freezing* terhadap viabilitas spermatozoa dimana nilai dari P<0,01. Sedangkan penambahan vitamin E pada pengencer tidak memberikan pengaruh nyata pada saat *Pre-Freezing* terhadap abnormalitas spermatozoa sapi simental dimana nilai dari P>0,05.

### DAFTAR PUSTAKA

- Astrini, E. A., Ducha, N., & Kuswanti, N. (2017). Implementasi pengencer cep-d terhadap motilitas spermatozoa sapi limousin yang disimpan pada suhu beku. *Lentera Bio*. Universitas Negeri Surabaya, Surabaya.
- Avida, N.A.(2009). Pengaruh tingkat konsentrasi kuning telur pada pengencer tris aminomethane terhadap kualitas spermatozoa kambing pe setelah proses pembekuan. [Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang].
- Bebas, W., Buyona, G.L., & Budiasa, M.K. (2016). Penambahan vitamin E pada pengencer BTS terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi landrace pada penyimpanan 15<sup>o</sup>c. *Buletin Veteriner Udayana*, 8 (1), 1 – 7.
- Breining, E., Beorlegui, N.B., & OFlaherty, C.M. (2004). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63, 2126-2135.
- Donnelly, E.T., McClure, M., & Lewis, S.E. (1999). The effect of ascorbate and alfa tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hidrogen peroxide-induced DNA damage ion human spermatozoa. *Joernal Mutagenesis* 14 (5), 505 – 512.
- Futino, D., Mendes, M., Matos, W., Mondadori, R., & Lucci, C. (2010). Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.*, 45, 214–220.

- Hartono, M. (2008). optimalisasi penambahan vitamin E dalam pengencer sitrat kuning telur untuk mempertahankan kualitas semen kambing boer. *J.Indon.Trop.Anim.Agric.* 33 (1).
- Hidayat, M. (2018). Kualitas semen beku sapi bali dengan penambahan berbagai vitamin E komersil dalam pengencer tris kuning telur. [Skripsi, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim, Riau].
- Iswanto, N., Suyadi, & Rachmawati, A. (2013). Pengaruh konsentrasi alfa-tocopherol yang berbeda dalam pengencer tris aminomethane kuning telur terhadap kualitas semen kambing boer yang disimpan pada suhu 5°C. [Skripsi, Universitas Brawijaya, Malang].
- Matahine, T. (2014). Efektifitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. *Jurnal Veteriner*, 2, 44-50.
- Ogbuewu, I.P., Aladi, N.O., Etuk, I.F., Opara, M.N., Uchegbu, M.C., Okoli, I.C., & Iloeje, M.U. (2010). Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. *Res. J. Vet. Sci.*, 3(3), 138–164
- Rahmawati, M.A., Susilawati, T., & Ihsan, M.N. (2015). Kualitas semen dan produksi semen beku pada sapi dan bulan penampungan yang berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 25(3), 25-36.
- Rizal, M., & Herdis. (2006). Inseminasi buatan pada domba. Bogor: PT Rineka Cipta.
- Suryohudoyo, P. (1995). oksidan, antioksidan dan radikal bebas dalam simposium dampak negatif radikal bebas pada organ tubuh dan manfaatnya antioksidan. Surabaya, Fakultas Kedokteran Unair.
- Susilawati, T. (2011). *Spermatology*. Malang, UB Press.
- Suyadi, S. (2012). Pengaruh a-tocopherol yang berbeda dalam pengencer dasar tris aminomethane – kuning telur terhadap kualitas semen kambing boer yang disimpan pada suhu 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 22 (3),1-8.
- Syafrizal, E. (2015). Kualitas semen beku kerbau toraya setelah thawing dengan penambahan kafein di updt-ib desa pucak kecamatan tompobulu Kabupaten Maros. [Skripsi, Universitas Hasanuddin].
- Yendraliza, Anwar, P., & Rodiallah, M. (2015). *Bioteknologi reproduksi*. Yogyakarta: Aswaja Pressindo.