

## Efektivitas Kombinasi Ekstak Buah Merah (*Pandanus conoideus Lamk*) dan Air Kelapa Hijau Terhadap Kualitas Semen Sapi Bali Selama Simpan Dingin

*Effectiveness of Red Fruit Extract (Pandanus conoideus Lamk) and Green Coconut Water Combination on Semen Quality of Bali Bull During Cold Storage*

**Mohamad Ervandi<sup>1\*</sup>, Susan Mokoolang<sup>2</sup>, Widiastuti Ardiansyah<sup>2</sup> dan Suci Ananda<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Program Studi Manajemen Sumber Daya Hayati, Universitas Muhammadiyah Gorontalo

Jalan Prof. Dr. Mansoer Pateda, Pentadio Timur, Telaga Biru, Gorontalo 97181, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi Peternakan, Universitas Muhammadiyah Gorontalo

Jalan Prof. Dr. Mansoer Pateda, Pentadio Timur, Telaga Biru, Gorontalo 97181, Indonesia

<sup>3</sup>Program Studi Peternakan, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

Jalan H.M. Yasin Limpo No 36, Gowa Sulawesi Selatan 92113, Indonesia

\*Korespondensi E-mail: [ervandi\\_husain@yahoo.co.id](mailto:ervandi_husain@yahoo.co.id)

Diterima 1 Agustus Mei 2023; Disetujui 1 Desember 2023

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui eektivitas kombinasi ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus Lamk*) dan air kelapa hijau terhadap kualitas semen sapi bali selama simpan dingin. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lapang Program Studi Peternakan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Muhammadiyah Gorontalo. Semen yang digunakan berasal dari 2 ekor sapi bali umur 2-3 tahun ditampung 2 kali seminggu . Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 Perkuan dan 10 ulang yang terdiri P0 (kontrol) = CEP-2 + kuning telur 10%, P1 = pengencer ekstrak buah merah + air kelapa + kuning telur 15%. P2 = pengencer ekstrak buah merah + air kelapa + kuning telur 15%+ fruktosa 1 mg/ml. P3 = pengencer ekstrak buah merah + air kelapa + kuning telur 15% + fruktosa 2 mg/ml. Data yang dihasilkan akan dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas dan viabilitas terbaik pada P0 ( $42,41 \pm 1.72\%$ ) dan ( $40,10 \pm 1.12\%$ ) serta abnormalitas yang rendah  $<10\%$  yang bertahan sampai hari ke-8 penyimpanan, kemudian disusul P2 ( $43,19 \pm 1.34\%$ ) dan ( $47,22 \pm 1.12\%$ ) serta abnormalitas dibawah  $<14\%$ . Setelah itu disusul P1 ( $42,26 \pm 1.40\%$ ) dan ( $45,28 \pm 1.19$ ) serta P3 ( $42,16 \pm 1.37\%$ ) dan ( $43,44 \pm 1.17\%$ ) masing-masing P1 dan P3 memiliki abnormalitas dibawah  $<14\%$ . Kesimpulannya ketiga pengencer P1, P2 dan P3 mampu mempertahankan motilitas, viabilitas dan abnormalitas sampai hari ke-5 setelah penyimpanan sehingga penggunaan kombinasi ekstrak buah merah dan air kelapa pada semen cair dapat digunakan untuk pelaksanaan IB di lapangan.

**Kata kunci:** Air Kelapa, Efektivitas, Ekstrak Buah Merah, Kualitas Semen, Sapi Bali.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effectiveness of the combination of red fruit extract (*Pandanus conoideus Lamk*) and green coconut water on the quality of Balinese cattle semen during cold storage. This research was conducted at the Field Laboratory of the Animal Husbandry Study Program, Faculty of Science and Technology Muhammadiyah University of Gorontalo. Semen used came from 2 Balinese cows aged 2-3 years accommodated 2 times a week. The research design used a Randomized Group Design (RAK) with 4 conditions and 10 repetitions consisting of P0 (control) = CEP-2 + 10% egg yolk, P1 = diluent of red fruit extract + coconut water + 10% egg yolk. P2 = red fruit extract diluent + coconut water + egg yolk 10% + fructose 1 mg/ml. P3 = red fruit extract diluent + coconut water + egg yolk 10% + fructose 2 mg/ml. The data generated will be analyzed using Analysis of Variance. The results showed that the best motility and viability in P0 ( $42.41 \pm 1.72\%$ ) and ( $40.10 \pm 1.12\%$ ) and low abnormality  $<10\%$  which lasted until the 8th day of storage, then followed by P2 ( $43.19 \pm 1.34\%$ ) and ( $47.22 \pm 1.12\%$ ) and abnormality below  $<14\%$ . After that followed by P1 ( $42.26 \pm 1.40\%$ ) and ( $45.28 \pm 1.19$ ) and P3 ( $42.16 \pm 1.37\%$ ) and ( $43.44 \pm 1.17\%$ ) each P1 and P3 had abnormalities below  $<14\%$ . In conclusion, the three diluents P1, P2 and P3 were able to maintain motility, viability and abnormality until the 5th day after storage so that the use of a combination of red fruit extract and coconut water in liquid semen can be used for the implementation of IB in the field.

**Keywords:** Coconut Water, Effectiveness, Red Fruit Extract, Semen Quality, Bali Bull.

## PENDAHULUAN

Peningkatan populasi ternak potong khususnya ternak sapi bali sejauh ini sudah banyak dilakukan dengan penerapan teknologi dibidang reproduksi ternak salah satunya adalah Inseminasi Buatan (IB) untuk mempercepat dan memperbanyak keturunan secara efisien. IB merupakan salah satu teknologi yang telah terbukti dapat meningkatkan populasi ternak dan juga meningkatkan kualitas genetik khususnya ternak sapi di Indonesia (Yekti, *et al.*, 2018; Ervandi, *et al.*, 2020; Istiqomah, dkk., 2023).

Namun demikian, yang terjadi saat ini pelaksanaan IB hanya tergantung pada ketersediaan semen beku disebabkan karena tidak semua daerah memiliki nitrogen cair karena ketersediaan nitrogen cair untuk media penyimpanan semen beku yang sulit didapat dan harganya sangat mahal (Ervandi, dkk., 2022). Susilawati, dkk (2016) menyatakan bahwa penggunaan semen beku dalam program IB terdapat permasalahan yaitu kurang lebih 30% spermatozoa mati pada saat pembekuan serta fertilitas rendah. Untuk itu, penggunaan semen cair berbahan alami dapat menjadi solusi alternatif untuk bisa diaplikasikan didaerah pedesaan yang sulit akan ketersediaan nitrogen cair. Semen cair

memiliki kelebihan yaitu tidak rumit dalam proses pembuatannya, mudah dilaksanakan pada daerah yang tidak ada nitrogen cair persentase motilitas rata-rata masih diatas 40% dan kemampuan fertilitasnya yang tinggi (Dacosta, *et al.*, 2016). Eektivitas semen cair lebih baik dibandingkan semen beku sehingga semen cair lebih sering digunakan (Kasminickham, *et al.*, 2011).

Berbagai bahan pengencer telah ditemukan dalam perkembangan oleh beberapa peneliti sebelumnya dengan teknik pengenceran semen cair, yang berbahan dasar alami seperti air kelapa, sari wortel, sari buah tomat, kuning telur, madu, filtrat jambu biji (Sumadiasa, *et al.*, 2015 ; Astuti, 2018 ; Malik, dkk., 2018 ; Marawali, dkk., 2019). Namun kualitas semen yang dihasilkan rata-rata bertahan selama rentan 3-4 hari. Untuk itu diperlukan pengencer kombinasi berbahan alami seperti buah merah dan air kelapa yang mampu bertahan dalam jangka waktu yang lama dan menjaga kualitas semen tetap terjaga serta daya fertilitasnya tetap tinggi.

Sari buah merah mengandung tokoferol,  $\beta$ -karoten, asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, vitamin C, kalsium, fosfor, dan besi (Tethool, dkk., 2021 ; Nurcholisa, *et al.*, 2021). Tabatabaei, *et al.*, (2011) melalui pemberian antioksidan seperti tokoferol,  $\beta$ -karoten maupun asam askorbat mampu memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa dari kerusakan morfologi sel yang dapat menyebabkan abnormalitas pada sel spermatozoa dengan cara mencegah efek buruk radikal bebas terhadap sel spermatozoa.

Air kelapa memiliki kandungan biokimiawi seperti glukosa, protein, lemak, vitamin C serta antioksidan yang dapat dijadikan sebagai bahan pengencer semen untuk menggantikan pengencer yang menggunakan bahan baku sintetis yang tidak menutup kemungkinan terpapar residu kimiawi yang bersifat reduktif bagi spermatozoa (Salim, dkk., 2019). Beberapa karbohidrat sederhana, mineral, dan zat-zat lain dalam pengencer diperlukan oleh spermatozoa dapat dipenuhi dari air kelapa (Muhammad, dkk., 2019). Dengan demikian dapat diperoleh sebuah terobosan baru untuk menggantikan bahan pengencer semen cair sintetis ke bahan pengencer berbasis bahan alami.

Berdasarkan pemikiran diatas, maka penelitian untuk menguji Efektivitas Kombinasi Ekstak Buah Merah (*Pandanus Conoideus Lam*) dan Air Kelapa Hijau Terhadap Kualitas Semen Sapi Bali Selama Simpan Dingin.

## MATERI DAN METODE

### Materi

Penelitian ini menggunakan semen sapi yang dikoleksi dari pejantan sapi bali berumur sekitar 2-3 tahun yang diperoleh dari Laboratorium Lapang Terpadu Universitas Muhammadiyah Gorontalo. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa  $\geq ++$ , motilitas individu  $\geq 70\%$ . Frekuensi penampungan semen dua kali seminggu.

### Metode

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 Perkuan dan 10 ulang. Pengelompokan berdasarkan waktu penampungan semen yang berbeda. Sedangkan perlakuan terdiri dari : P0 (kontrol) = CEP-2 + kuning telur 10%. P1 = pengencer ekstrak buah merah + air kelapa + kuning telur 15%. P2 = pengencer ekstrak buah merah + air kelapa + kuning telur 15%+ fruktosa 1 mg/ml. P3 = pengencer ekstrak buah merah + air kelapa + kuning telur 15% + fruktosa 2 mg/ml.

### Pengencer Semen

#### Pengencer Kombinasi Air Ekstak Buah Merah dan Air Kelapa

Bahan pengencer ekstrak buah merah dimana buah merah ditimbang 100 gr, ditambahkan aquades 300 ml, selanjutnya dibelender selama 5 menit, kemudian diamkan selama 2,5 jam agar cairan mengendap setelah itu disaring menggunakan kain saring, penyaring dilakukan sebanyak 2 kali. Penyaring kedua menggunakan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak buah merah, kemudian dikombinasi dengan air kelapa hijau yang berumur 7-8 bulan sebelum ditambahkan dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 50 °C kurang lebih 20 menit agar dapat menonaktifkan enzim pada air kelapa (Muhammad, dkk., 2019) tidak lupa ditambahkan fruktosa 10 dan 20 mg/ml, antibiotik penicilin 1 mg/ml, sorbitol g/L, streptomycin sulfat 1 mg/ml dan gentamicin 0,05 g/ml. Setelah pengencer kombinasi ekstrak buah merah + air kelapa dibuat, untuk penggunaan selanjutnya ditambahkan kuning telur sebagai pelindung membran. Bahan tambahan kuning telur akan ditambahkan ke pengencer ekstrak buah merah dengan konsentrasi 100%. Kemudian di stirer selama 30 menit setelah itu disentrifius dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Pengencer ekstrak buah merah + air kelapa dengan bahan tambahan kuning telur 15% disimpan dalam refrigerator suhu 3-5°C kemudian pengencer ekstrak buah merah+ air kelapa+kuning telur 15% siap untuk digunakan.

### Pengencer CEP-2+ Kuning Telur 10%

Pengencer CEP-2+ kuning telur 10% yang telah dikembangkan oleh Verberckmoes at al., (2004) terdiri dari NaCl 15 mmol/l, KCl 7 mmol/l, CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 3 mmol/l, MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 4 mmol/l, NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mmol/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 8 mmol/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol/l, Fruktosa 55 mmol/l, Sorbitol 1 g/l, BSA 2 g/l, Tris 133,7 mmol/l, gentamicin 0,05 g/l, asam sitrat 42 mmol/l. Bahan-bahan diperoleh dan dibuat aliquot. Osmolaritas pengencer sebesar 320 mOsm, dengan pH sedikit asam yaitu 6,6.

### Peubah Penelitian

Peubah yang diamati adalah motilitas, viabilitas dan abnormalitas sesuai dengan perlakuan yang ada.

### Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa diamati dengan meneteskan semen pada *object glass*, kemudian ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 10 X 40 (Kusumawati, dkk., 2018). Menghitung motilitas spermatozoa berdasarkan rumus (Hafez and Hafez, 2008 ; Susilawati, 2011).

$$M = [(Y - X) / Y] \times 100\%$$

Keterangan: X = Spermatozoa tidak motil

Y = Konsentrasi total spermatozoa

### Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas diamati dengan pewarnaan dengan *eosin-negrosin*. Semen diteteskan ke *objeck glass*. Setelah dihomogenkan, Usap menggunakan *objeck glass*. Mengeringkan preparat menggunakan pemanas sampai kering. Mikroskop digunakan untuk memeriksa objek dengan pembesaran 10 X 40. Spermatozoa berwarna terang dianggap hidup serta merah tua dianggap mati. Jumlah spermatozoa hidup dapat dihitung dari 200 pengamatan sel spermatozoa serta hasilnya dinyatakan pada persentase (Hafez and Hafez, 2008 ; Susilawati, 2011).

$$X = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan : X = daya tahan hidup spermatozoa

a = jumlah spermatozoa hidup

b = total spermatozoa diamati

### Abnormalitas Spermatozoa

Preparat untuk pengamatan abnormalitas seperti preparat pengamatan hidup-mati yang diamati bentuk morfologinya. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop pemersaran 10 x 40. Hitung jumlah spermatozoa abnormal dari 200 sel spermatozoa, hasilnya dinyatakan dalam persentase (Hafez and Hafez, 2008 ; Susilawati, 2011).

$$y = \frac{c}{d} x 100\%$$

Keterangan : y = abnormalitas spermatozoa

c = jumlah spermatozoa abnormal,

d = jumlah spermatozoa diamati

### Analisis Data

Data yang dihasilkan akan dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam. Selanjutnya apabila diantara perlakuan menunjukkan perbedaan nyata atau sangat nyata, akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*). Apabila perlakuan pengencer terbaik antara (CEP-2+Kuning Telur 10%) dan (EBM+AK+KT+Fruktosa) kemudian diuji menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40% (Sudarwati, dkk., 2019).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Karakteristik Semen Segar Sapi Bali

Kualitas semen segar sapi bali yang diperoleh pada penelitian ini memiliki motilitas diatas 70%. Kualitas semen segar yang diperoleh disajikan pada Tabel 1.

Pemeriksaan semen segar secara makroskopis yang diperoleh pada penelitian ini disajikan pada (Tabel 1) didapatkan rata-rata volume semen sapi bali  $7,21 \pm 0,66$  ml lebih tinggi dari hasil penelitian Fazrien, dkk., (2020) ; Nabilla, dkk., (2018) yaitu  $6,9 \pm 0,78$  ml dan  $6,44 \pm 0,23$  ml. Garner dan Hafez (2008) menyatakan bahwa volume semen sapi dalam satu ejakulasi yaitu sebesar 5-8 ml. Warna semen sapi bali yang dihasilkan yaitu krem, hasil ini dikategorikan baik dan juga normal. Susilawati, (2013) ; Feradis, (2010) menyatakan bahwa semen normal berwarna putih kekuningan (krem) atau putih susu, derajat kekeruhan tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Derajat keasaman (pH) semen sapi bali  $6,31 \pm 0,06$  lebih rendah dari hasil Yekti, dkk., (2018) ; Dzulqarnain, dkk., (2022)  $6,63 \pm 0,08$  dan  $6,42 \pm 0,23$ .

Tabel. 1. Kualitas Semen Segar Sapi Bali

Parameter	Rataan ± SD
<b>Makroskopis</b>	
Volume (ml)	7,21 ± 0,66
Warna	Krem
pH	6,31 ± 0,06
Aroma	Khas
Konsistensi	Kental
<b>Mikroskopis</b>	
Motilitas Massa	2+
Motilitas Individu (%)	74,50 ± 2,68
Viabilitas (%)	89,28 ± 2,48
Abnormalitas (%)	4,21 ± 0,26
Konsentrasi (10 <sup>7</sup> /ml)	1551,29 ± 26,90

Kualitas semen segar sapi bali memiliki konsistitensi kental. Ismaya, (2014) menyatakan bahwa konsistensi semen dapat diketahui dengan cara menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan-lahan dengan memprediksikan konsentrasi spermatozoa yaitu 1.000-2.000 juta/ml semen. Sudarmono, *et al.*, (2015) meyakini bahwa semen yang baik memiliki poin penting yang harus diperhatikan yaitu kondisi semen setelah penampungan pada ternak sapi memiliki pH 6,45-6,57, konsentrasi 1223,7-1961,8, sedangkan motilitas individu 70% dan gerakan massa 2+. Secara mikroskopis rata-rata motilitas yang dihasilkan dikategorikan menjadi dua yaitu motilitas massa dan motilitas individu. Motilitas massa sapi bali yaitu 2+, sedangkan motilitas individu 74,50 ± 2,68%.

Rataan motilitas massa dan individu ini tergolong baik dan sudah sesuai standar. Susilawati (2013) menyatakan bahwa motilitas semen di atas 70% lebih bertahan hidup dibanding rendah di bawah 70%. Rataan viabilitas dan abnormalitas semen sapi bali mencapai 89,28 ± 2,48% dan 4,21 ± 0,26%. Persentase viabilitas dan abnormalitas semen segar sapi bali masih dalam kisaran normal dan tergolong tinggi sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2008) ; Susilawati, (2011) bahwa viabilitas tergolong baik minimal 80% dan abnormalitas semen tidak boleh melebihi 20%. Berdasarkan pengamatan karakteristik semen segar sapi bali dalam penelitian ini memenuhi syarat kualitas untuk diproses ketahap selanjutnya.

### Kualitas Semen Setelah Perlakuan

Rataan Motilitas Individu semen sapi bali setelah perlakuan tersaji pada Tabel 2. Motilitas individu sapi bali memperlihatkan daya tahan motilitas individu tertinggi pada pengencer P0 mencapai 8 hari dengan nilai  $42,41 \pm 1.72\%$ , sedangkan pengencer P2 dengan nilai motilitas  $43,19 \pm 1.34\%$  disusul pengencer P1 dan P3 masing-masing nilai motilitas  $42,26 \pm 1.40\%$  dan  $42,16 \pm 1.37\%$  dengan rata-rata daya tahan motilitasnya hanya mencapai 5 hari.

Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan berbeda sangat Nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap motilitas individu sapi bali pada hari ke- 5 sampai hari ke- 8 simpan. Uji Beda Nyata Terkecil diperoleh hasil perkuan pengencer P0 yang terbaik yaitu  $42,41 \pm 1.72\%$  sampai hari ke- 8. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan Susilawati, dkk., (2015) penggunaan pengencer CEP2+kuning telur 10% pada sapi Bali dapat bertahan hingga hari ke 7-8 dengan persentase motilitas sebesar  $45,75 \pm 2,06\%$ . Sedangkan untuk perlakuan P1, P2, dan P3 motilitas bertahan hingga hari ke- 5 masa simpan. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena kombinasi ekstrak buah merah dan air kelapa mengandung  *tokoferol*, *β-karoten*, kuning telur dan *fruktosa* dapat memberikan perlindungan terhadap membran sel spermatozoa dari kerusakan morfologi sel yang dapat menyebabkan penurunan kualitas dan mencegah efek buruk radikal bebas pada sel spermatozoa selama proses pendiginan. Hasil ini sesuai pendapat Tabatabaei, *et al.*, (2011) melalui pemberian antioksidan seperti tokoferol, *β-karoten* maupun asam askorbat mampu memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa dari kerusakan morfologi sel yang dapat menyebabkan abnormalitas pada sel spermatozoa dengan cara mencegah efek buruk radikal bebas terhadap sel spermatozoa.

Air kelapa memiliki kandungan biokimiawi seperti glukosa, protein, lemak, vitamin C serta antioksidan yang dapat dijadikan sebagai bahan pengencer semen untuk menggantikan pengencer yang menggunakan bahan baku sintetis yang tidak menutup kemungkinan terpapar residu kimiawi yang bersifat reduktif bagi spermatozoa (Salim, dkk., 2019). Selain itu, air kelapa mengandung zat-zat esensial seperti gula monosakarida, vitamin, mineral, dan asam amino yang dapat memperthankan motilitas sampai hari ke 3 (Yohana, *et al.*, 2014). Susilawati (2011) menjelaskan bahwa fruktosa adalah gula dasar dari seminal.



Tabel 2. Rataan Motilitas Individu Sapi Bali Pada Berbagai Kombinasi Pengencer Selama Pendinginan

Perlakuan	Rata-rata Motilitas (%) ± SD								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
P0 (CEP-2 + KT 10%)	72,42 ± 1.24	65,55 ± 1.24	62,70 ± 0.92	59,51 ± 0.72	55,64 ± 0.82 <sup>b</sup>	50,03 ± 0.51 <sup>b</sup>	46,98 ± 1.10 <sup>b</sup>	42,41 ± 1.72 <sup>b</sup>	32,30 ± 0.21 <sup>b</sup>
P1 (EBM+AK+KT 15%)	70,64 ± 1.81	65,54 ± 0.76	63,32 ± 0.78	51,14 ± 0.43	42,26 ± 1.40 <sup>a</sup>	23,06 ± 0.42 <sup>a</sup>	14,78 ± 0.21 <sup>a</sup>	10,28 ± 0.20 <sup>a</sup>	9,32 ± 0.00 <sup>a</sup>
P2 (EBM+AK+KT 15%+ Fruk 1 mg/ml)	70,43 ± 1.21	64,5 ± 0.42	62,17 ± 0.54	53,57 ± 0.08	43,19 ± 1.34 <sup>a</sup>	27,21 ± 0.14 <sup>a</sup>	16,29 ± 0.11 <sup>a</sup>	13,41 ± 0.26 <sup>a</sup>	11,21 ± 0.00 <sup>b</sup>
P3 (EBM+AK+KT 15%+ Fruk 2 mg/ml)	69,41 ± 1.21	67,4 ± 0.43	63,2 ± 0.54	45,61 ± 1.06	42,16 ± 1.37 <sup>a</sup>	20,28 ± 0.43 <sup>a</sup>	12,9 ± 0.21 <sup>a</sup>	10,51 ± 0.26 <sup>a</sup>	9,10 ± 0.00 <sup>a</sup>

Keterangan : Superskrip pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01) antar perlakuan

Hasil menunjukkan bahwa, spermatozoa yang disimpan dalam CEP2+kuning telur 10% mampu menyediakan lingkungan yang baik bagi spermatozoa dan melindungi membran sehingga permeabilitas membran tetap normal (Juniandri, dkk., 2014 ; Ervandi, dkk., 2020). Kuning telur dalam jumlah yang seimbang dapat menjaga membrane sel dari kerusakan ketika pemerosesan dan penyimpanan disuhu dingin dan dapat menjadi krioprotektan ekstraseluler karena mengandung lesitin dalam jumlah yang cukup (Sholikah, dkk., 2022 ; Ervandi, dkk., 2013). Kuning telur sebagai bahan krioprotektan ekstraseluler berfungsi sebagai media penyedia makanan, sumber energy dan pelindung semen dari *cold shock* (Widiastuti, dkk., 2018). Penambahan kuning telur pada pengencer CEP2 mampu melindungi spermatozoa dari ROS, melindungi integritas membran dan mempertahankan keutuhan ultrastruktur membran spermatozoa (Ducha, *et al.*, 2013). Susilawati (2011) BSA dan kuning telur sebagai komponen makromelekul yang berperan dalam melindungi permeabilitas dan integritas selubung lipoprotein penyusun membran spermatozoa. Menurut Kurniawan, dkk.,(2013), motilitas spermatozoa terjadi karena adanya gerakan pada mikrorubulus yang dipacu oleh energy yang diproduksi di mitokondria yang menghasilkan ATP dan ADP.

Tabel 3. Rataan Viabilitas Spermatozoa Sapi Bali Pada Berbagai Kombinasi Pengencer Selama Pendinginan

Perlakuan	Rata-rata Viabilitas Spermatozoa (%) $\pm$ SD								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
P0 (CEP-2 + KT 10%)	71,62 $\pm$ 1.11	68,61 $\pm$ 1.10	66,36 $\pm$ 0.13	58,60 $\pm$ 0.36	54,17 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	47,33 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	45,60 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>	40,10 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	37,14 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>
P1 (EBM+AK+KT 15%)	70,33 $\pm$ 1.48	66,19 $\pm$ 0.17	65,32 $\pm$ 0.26	53,19 $\pm$ 0.10	45,28 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	30,53 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	25,37 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	16,62 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
P2 (EBM+AK+KT 15%+ Fruk 1 mg/ml)	70,42 $\pm$ 1.13	66,27 $\pm$ 0.42	65,36 $\pm$ 0.40	53,63 $\pm$ 0.12	47,22 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	37,16 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	27,53 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	17,41 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	12 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
P3 (EBM+AK+KT 15%+ Fruk 2 mg/ml)	70,31 $\pm$ 1.15	65,16 $\pm$ 0.48	64,12 $\pm$ 0.25	50,44 $\pm$ 1.10	43,44 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	33,17 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	22,13 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	13,16 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	9 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>

Keterangan : Superskrip pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) antar perlakuan

Rataan viabilitas semen sapi bali setelah perlakuan tersaji pada Tabel 3. Viabilitas sapi bali memperlihatkan kemampuan daya tahan hidup tertinggi pada pengencer P0 mencapai 8 hari dengan nilai  $40,10 \pm 1.12\%$ , sedangkan pengencer P2 dengan nilai viabilitas  $47,22 \pm 1.12\%$  disusul pengencer P1 dan P3 masing-masing nilai viabilitas  $45,28 \pm 1.19\%$  dan  $43,44 \pm 1.17\%$  dengan rata-rata daya tahan hidup spermatozoa mencapai 5 hari. Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan berbeda sangat Nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap daya tahan hidup spermatozoa sapi bali pada hari ke- 5 sampai hari ke- 9 simpan.

Hasil ini kemungkinan disebabkan karena sifat *fruktosa*, *BSA*, dan *sorbitol* yang terkandung dalam pengencer CEP-2 + kuning telur 10% ditambah lagi adanya kuning telur yang mengandung zat lipoprotein dan lesitin dapat mempertahankan kestabilan pH semen dan juga melindungi spermatozoa dari *cold shock* pada spermatozoa sapi bali dengan lama simpan mencapai 8 hari. Hasil ini lebih rendah dari penelitian Ducha, dkk., (2013) pengencer CEP-2 + kuning telur 10% mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa sampai hari ke 8 dengan persentase  $85,53 \pm 6,83\%$  masa penyimpanan.

Fruktosa termasuk sumber energi yang sangat baik bagi spermatozoa dikarenakan jalur metabolisme yang lebih pendek yaitu melalui proses fruktoliasis (Muhammad, dkk., 2018). Kombinasi sari buah merah dan air kelapa dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa sapi bali sampai hari ke-5 masa simpan. Tabatabaei, et al., (2011)

mengemukakan bahwa sari buah merah mengandung tokoferol,  $\beta$ -karoten, asam oleat, asam linoleat, asam linolenat, vitamin C, kalsium, fosfor, dan besi. Penggunaan air kelapa (*Cocos nucifera*) memiliki keunggulan yaitu tidak berakibat *toxic* pada spermatozoa, bersifat buffering, dari segi biaya murah, praktis dan efektif (Cardoso et al., 2005).

Kuning telur mengandung asam amino dan berperan menjaga integritas selubung lipoprotein membrane spermatozoa (Aboagla dan Terada, 2004). Senyawa lipoprotein yang terdapat dalam kuning telur berperan melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Tarig et al., 2017). Sedangkan untuk perlakuan P1, P2, dan P3 viabilitas bertahan hingga hari ke-5 masa simpan dan mengalami penurunan. Hal ini kemungkinan penurunan tersebut disebabkan terjadinya kerusakan membrane plasma akibat pengaruh *cold shock* selama penyimpanan pada suhu rendah (Pereira, et al., 2010) dan juga disebabkan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan disebabkan oleh meningkatnya jumlah spermatozoa rusak akibat kekurangan energy (Solihati, dkk., 2008).

Rataan abnormalitas semen sapi bali setelah perlakuan tersaji pada Tabel 4. Spermatozoa yang mempunyai penyimpangan morfologi berbeda dari spermatozoa yang normal disebut abnormal dan akan mempengaruhi tingkat fertilisasi. Abnormalitas spermatozoa sapi bali yang memberikan hasil terbaik pada pengencer P0 mulai dari ke-1 hingga hari ke-9, kemudian P2 disusul P1 dan P3. Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan berbeda sangat Nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap abnormalitas spermatozoa sapi bali selama simpan dingin. Rataan abnormalitas spermatozoa dikategorikan normal. Arifiantini, dkk., (2005) menyatakan bahwa semen berkualitas baik memiliki 5-15% spermatozoa abnormal, berbeda dengan pendapat, Ihsan (2009) spermatozoa abnormal tidak boleh lebih dari 20% untuk dapat dimanfaatkan untuk IB dan jika abnormal  $> 20\%$  maka daya fertilitas akan berkurang. Apabila dilihat dari keseluruhan perlakuan P0, P1, P2 dan P3 bahwa persentase abnormalitas penelitian ini masih dikategorikan sangat baik karena dibawah 20% hingga hari ke-9.

Abnormalitas spermatozoa merupakan penyimpangan morfologi pada kerangka normal spermatozoa (Adnyani dkk., 2018). Struktur sel yang menyimpang atau abnormal dapat mengganggu pembuahan serta menimbulkan hambatan pada saat fertilisasi dan tingkat implantasi maupun kebuntingan akan menurun (Afiati dkk., 2015). Abnormalitas rendah dimasing-masing perlakuan kemungkinan disebabkan karena adanya zat lipoprotein dan lesitin yang terkandung dalam kuning telur yang mampu mempertahankan dan juga

melindungi integritas selubung membrane plasma semen dari *cold shock* sehingga dapat menekan kerusakan pada membrane plasma spermatozoa sapi bali.

Tabel 4. Rataan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Bali Pada Berbagai Kombinasi Pengencer Selama Pendinginan

Perlakuan	Rata-rata Abnormalitas Spermatozoa (%) $\pm$ SD								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
P0 (CEP-2 + KT 10%)	4,21 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	4,31 $\pm$ 1,13 <sup>b</sup>	4,81 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	5,60 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	5,33 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	5,51 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup>	6,00 $\pm$ 1,66 <sup>b</sup>	7,13 $\pm$ 1,23 <sup>b</sup>	8,67 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
P1 (EBM+AK+KT 15%)	7,10 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	7,22 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	8,31 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup>	9,65 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	10,26 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>	11,53 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	12,36 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	13,88 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	13,30 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>
P2 (EBM+AK+KT 15%+ Frukt 1 mg/ml)	7,06 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	7,82 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	7,90 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	8,76 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	9,19 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>	10,42 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	12,19 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	13,10 $\pm$ 1,10 <sup>a</sup>	13,22 $\pm$ 0,77 <sup>a</sup>
P3 (EBM+AK+KT 15%+ Frukt 2 mg/ml)	7,31 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup>	7,82 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	8,13 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	9,66 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	10,66 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup>	12,83 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>	13,14 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	13,260 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	13,51 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup>

Keterangan : Superskrip pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ) antar perlakuan

Susilwati (2011) mengemukakan bahwa lipoprotein dan lesitin mampu mempertahankan dan juga melindungi membrane spermatozoa pada proses penyimpanan. Peningkatan abnormalitas terjadi pada P1, P2, dan P3 kemungkinan disebabkan karena semakin lama semen disimpan semakin berkurang ketersediaan makanan bagi spermatozoa sehingga terjadi ketidak seimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama proses penyimpanan (Manehat, dkk., 2021). Herdis (2006) menyatakan bahwa proses pengolahan dan penyimpanan akan menyebabkan perubahan fisik pada semen yang mempengaruhi motilitas spermatozoa.

## KESIMPULAN

Pengencer CEP2+ KT 10% memiliki kualitas lebih tinggi dengan lama simpan mencapai 8 hari dengan motilitas individu dan viabilitas 42,41 $\pm$ 1,72% dan 40,10 $\pm$ 1,12% dengan abnormalitas <10 %. Kemudian disusul pengencer P2, P1 dan P3 baik tanpa fruktosa maupun penambahan fruktosa mampu mempertahankan motilitas, viabilitas dan abnormalitas sampai hari ke-5 setelah penyimpanan sehingga penggunaan kombinasi

ekstrak buah merah dan air kelapa pada semen cair dapat digunakan untuk aplikasi pelaksanaan IB di lapangan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla, E. M. E., and Terada, T. 2004. Effects of supplementation of trehalosa extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, 45, 513 – 520.
- Adnyani, N. L. A., Sumardani, N. L. G. dan Sarini, N. P. 2018. pengaruh lama thawing pada uji kualitas semen beku sapi bali produksi UPT BIBD Baturiti sebelum idistribusikan. *Jurnal Peternakan Tropika*, 6(3), 626-636.
- Afiati, F., Yulnawati, M. R., dan Arifiantini, R. I. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1(4), 930-934.
- Arifiantini, L., Yusuf, T.L. dan Graha, N. 2005 . Longivitas dan recovery rate pasca thawing semen beku sapi Friesian Holstein menggunakan bahan pengencer yang berbeda. *Buletin Peternakan*, 2(2), 57-61.
- Astuti, M. E. 2018. Pengaruh penambahan sari buah tomat (*Solanum lycopersicum*) sebagai pengencer alami terhadap kualitas penyimpanan spermatozoa sapi bali (*Bos sondaicus*). *Bionature*, 18(2), 129-139.
- Azzahra, F. Y., Setiatin, E.T. dan Samsudewa, D. 2016. Evaluasi motilitas dan persentase hidup semen segar sapi PO Kebumen pejantan muda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 11(2), 99-107.
- Cardoso, R.C.S., Silva, A.R. and Silva, L.D.M. 2005. Use of the powdered coconut water (ACP-106 ®) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction*, 2(4), 257-262.
- Dacosta, N., Susilawati, T., Isnaini, N. dan Ihsan, M.N. 2016. Effect of different dilution materials usage on Indonesia peranakan ongole bull sperm quality during cooling process. *Indo American Journal of Pharmaceutical Scinces*, 3(4), 379-385.
- Ducha, N., Susilawati, T., Aulannia'am, Wahjuningsih, S. dan Pangestu, M. 2013. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi limousin selama penyimpanan pada refrigerator dalam pengencer CEP-2 dengan suplementasi kuning telur. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1), 5-8.
- Dzulqarnain, A., Saili, T., dan Rusdin, M. 2022. Kualitas spermatozoa sapi bali setelah preservasi menggunakan pengencer tris kuning telur dan madu dengan level berbeda. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu*, 4(3), 236-242.
- Ervandi, M., Ihsan, M. N., Wahjuningsih, S., Yekti, A.P.A. and Susilawati, T. 2020. Relationship between body condition score on the service per conception and conception rate of BX cows. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 30(1), 80-85.
- Ervandi, M., Ardiansyah, W., Reppi, T., Mokoolang, S., Korompot, I. dan Pomolango, R. 2022. edukasi masyarakat peternak dalam pemanfaatan teknologi IB untuk

- mendukung produksi bibit sapi bali. *HUIDU: Jurnal Pengabdian Masyarakat Geoscience*, 1(2), 73-79.
- Ervandi, M., Ihsan, M. N., Wahjuningsih, S. and Susilawati, T. 2020. Pregnancy rate and reproductive disorders examination of inseminated brahman cross by rectal palpation and ultrasonography. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 15(1), 73-80.
- Evandi, M., Susilawati, T., dan Wahyuningsih, S. 2013. Pengaruh pengencer yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa sapi hasil sexing dengan gradien albumin (Putih Telur). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 18(3), 177-184.
- Fazrien, W. A., Herwijanti, E., dan Isnaini, N. 2020. Pengaruh Perbedaan Individu terhadap Kualitas Semen Segar dan Beku Pejantan Unggul Sapi Bali. *Jurnal Sains Peternakan*, 18(1), 60-65.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Alfabeta. Bandung
- Hafez, E.S.E., and Hafez, B. 2008. *Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. Reproduction in Farm Animal*. Edited by B. Hafez, and E.S.E. Hafez 7<sup>th</sup> Edition. Blackweell Publishing. USA
- Herdis, M. Surachman, Rizal, M., Budiono, A., and Yulnawati. 2006. Pengaruh penambahan trehalosa dalam pengencer tris terhadap kualitas semen cair domba garut (*Ovis aries*). *Jurnal Ilmiah Biologi Biosfera*, 23 (1), 24 – 30.
- Ihsan, N.M. 2009. *Bioteknologi Reproduksi Ternak*. UB Press. Malang
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Istiqomah, H. N., Ervandi, M., Korompot, I., Repi, T., dan Buhang, I.S. 2023. Kualitas semen beku sapi bali (*Bos sondaicus*) pada lama thawing yang berbeda di Dinas Pertanian Provinsi Gorontalo. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*, 9(1), 20-30.
- Juniandri., Susilawati, T. , dan Isnaini, N. 2014. Perbandingan pengencer andromed dan CEP-2 terhadap kualitas spermatozoa sapi hasil sexing dengan sentrifugasi gradient densitas percoll. *Jurnal Veteriner*, 15(2), 252-262.
- Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., and Pelzer, K. 2011. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Rumin Res.* 99, 208-213.
- Kurniawan, I.Y., Basuki, F., dan Susilawati, T. 2013. Penambahan air kelapa dan gliserol pada penyimpanan sperma terhadap motilitas dan fertilitas spermatozoa ikan mas (*Cyprinus carpio L.*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 2 (1), 51-65
- Kusumawati, E. D., Rahadi, S., Santoso, S. dan Yulianti, D.L. 2018. Pengaruh lama thawing yang berbeda pada suhu 25°C terhadap kualitas semen beku sapi ongole. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 6(1), 119-123.
- Malik, A., Fauzi,R., Zakir, M.I. dan Sakiman, S. 2018. Subtitusi madu asli pengganti gliserol dalam pembekuan pada kualitas pasca-thawing spermatozoa sapi bali. *Acta Veterinaria Indonesian*, 5(2), 98-104.
- Manehat., Dethan, F. D. dan Tahuk, A.A. 2021. Motilitas, viabilitas, abnormalitas spermatozoa dan pH semen sapi bali dalam pengencer sari air tebu-kuning telur yang disimpan dalam waktu yang berdeda. *Journal Of Tropic Animal Science And Technology*, 3(2), 76- 90.

- Marawali, A., Abdullah, M.S., dan Jalaludin, J. 2019. Efektivitas suplementasi filtrat jambu biji dalam pengencer air kelapa-kuning telur terhadap kualitas semen cair sapi bali. *Jurnal Veteriner*, 20(1), 20-29.
- Mbaye, M.M., El Khalfi B., Addoum, B., Mar ,P.D., Saadani, B., Louanjli. N., and Soukri, A. 2019. The effect of supplementation with some essential oils on the mobility and the vitality of human sperm. *Hindawi e Scientific World Journal*, 9 (1), 1-6.
- Muhammad, D., Isnaini, N., Kuswati, Yekti, A. P. A., Aryogi, Lutfi,M., Lukman, H.Y. dan Susilawati, T. 2019. Pengaruh berbagai formulasi pengencer dasar air kelapa terhadap kualitas semen cair sapi PO (Peranakan Ongole) selama simpan dingin. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 29 (1), 1 - 8
- Muhammad, D., Isnaini, N., Kuswati, Yekti, A. P. A. Aryogi, Lutfi, M., Sunarto L. A. dan Susilawati, T. 2018. Pengaruh Penambahan Fruktosa dalam Pengencer Air Kelapa Hijau Terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi PO (Peranakan Onggole). *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 13 (4), 318-324
- Nabilla, A., Arifiantini, R. I., dan Purwantara, B. 2018. Kualitas semen segar sapi bali umur produktif dan non-produktif serta penentuan konsentrasi krioprotektan dalam pengencer tris kuning telur. *Jurnal Veteriner*, 19(2), 242-250.
- Nurcholisa, A., Furqonb, Arifiantini, R. I. and Salamony, S. M. 2021. Supplementation of pandanus conoideus oil in cryopreservation diluents for maintaining the semen quality of ongole grade bull. *Tropical Animal Journal*, 44(2), 146-151
- Salim, M.A., Ihsan, M. N., Isnaini, N., dan Susilawati, T. 2019. Kualitas semen cair kambing boer berbahan pengencer air kelapa muda varietas viridis setelah simpan dingin. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Topis*, 6(1), 78-84
- Sholikah, N., Susilowati, S., Tribudi. Y.A., , dan Sulistyowaty, D. 2022. Kualitas semen cair kambing boer dalam pengencer air kelapa muda dengan penambahan sari kedelai. *Jurnal Veteriner*, 23(2), 202-210.
- Solihati, N., Idi, R., Rasad, S.D., Rizal, M. dan Fitriati, M. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi peranakan Ongole (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *Animal Production*, 10(1), 22-29.
- Sudarwati, H., Natsir, M.H. dan Nurgiatiningsih, V.M. A. 2019. *Statistika dan Rancangan Percobaan Penerapan Dalam Bidang Peternakan*. Universitas Brawijaya (UB Prees). Malang.
- Sumadiasa, I. L., Susilawati, T., Ciptadi, G., and Isnaini, N. 2015. The potency of guava filtrate (*psidium guajava linn*) for preservation of bali bull spermatozoa. *IOSRJournal of Agriculture and Veterinary Science*, 8 (5), 51-57.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya (UB Press). Malang.
- Susilawati, T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak*. UB Press. Malang
- Susilawati, T., Wahyudi, F. E., Anggraeni, I., Isnaini, N., dan Ihsan, M.N. 2015. Penggantian bovine serum albumin pada pengencer cep-2 dengan serum darah sapi dan putih telur terhadap kualitas semen cair sapi limousin selama pendinginan. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 10 (1), 98-102
- Susilawati, T., Isnaini, N., Yekti, A. P. A., Nurjannah, I., Errico, E., dan Dacosta. 2016. Keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen beku dan semen cair pada sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 26 (3), 14-19.

- Tabatabaei, S., Batavani, R. and Ayen, E. 2011. Effects of vitamin c addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. *Journal Veterinary Research Forum*, 2(2), 103-11.
- Tarig, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y. M., Baiee, F. H., and Ebrahimi, M. 2017. Effect of different concentrations of soybean lecithin and virgin coconut oil in Tris-based extender on the quality of chilled and frozen-thawed bull semen. *Veterinary World*, 10(6), 672-678.
- Tethool, A.N., Ollong, A. R., dan Koibur, J. F. 2021. Pengaruh sari buah merah (*Pandanus conoideus lam*) terhadap abnormalitas spermatozoa ayam kampung. *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*. 11(2), 92 - 98
- Yekti, A.P.A, Kusumawati, E. D., Kuswati, Ridhowi, K., Sudarwati, Isnaini, N., and Susilawati, T. 2018. Succesfull of artificial insemination by using chilled semen on brahman cross cows. *Proceedings of the 1st International Conference in One Health (ICOH 2017)*, 221-226.
- Yohana, T., Ducha, N., dan Rahardjo. 2014. Pengaruh pengencer sintetis dan alami terhadap motilitas spermatozoa sapi brahman selama penyimpanan dalam suhu dingin. *Lentera Bio*, 3(3) , 261-265.