



**VIABILITAS POST EKUILIBRASI DAN
RECOVERY RATE SPERMATOZOA SAPI
SIMMENTAL DENGAN PENAMBAHAN LAKTOSA
DAN SUKROSA DALAM PENGENCER
ANDROMED**

*(Post Equilibration Viability and Recovery Rate of Simmental Bull Sperm
with Addition of Lactose and Sucrose in Andromed[®] Diluent)*

¹Farhan Syaifullah, ²Khaeruddin, ³Agus, ⁴Azmi Mangalisu, ⁵Rajmi Faridah, ⁶Sitti Farida,
⁷Junaedi

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Sinjai. Jl. Teuku Umar No. 8, Sinjai Utara 92611, Sulawesi Selatan, Indonesia

²Unit Pelaksana Teknis Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan, Sulawesi Selatan, Indonesia

³Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian Perikanan dan Peternakan, Universitas Sembilanbelas November Kolaka, Jl. Pemuda No. 339, Kolaka 93517, Sulawesi Tenggara, Indonesia

Email:
erukhaeruddin@gmail.com

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh berbagai konsentrasi penambahan laktosa dan sukrosa dalam pengencer AndroMed terhadap viabilitas spermatozoa sapi Simmental post-ekuilibrasi dan recovery rate. Rancangan acak lengkap (RAL) digunakan pada penelitian ini dengan 7 taraf perlakuan berupa penambahan sukrosa 0, 0.4, 0.6, 0.8%, penambahan laktosa 0.4, 0.6, 0.8% dalam pengencer AndroMed, setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan. Semen sapi dikoleksi menggunakan vagina buatan, segera setelah koleksi semen dilakukan pengenceran sesuai perlakuan. Semen cair dikemas dalam *straw* dengan jumlah spermatozoa minimal 25 juta setiap *straw*. Ekuilibrasi semen dilakukan selama 2 jam pada suhu 5 °C, dilanjutkan tahap pre-freezing, freezing, dan *thawing* 30 detik pada suhu 37 °C. Parameter penelitian ini adalah karakteristik semen segar, viabilitas spermatozoa post ekuilibrasi dan *recovery rate*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan sukrosa dan laktosa dengan konsentrasi berbeda dalam pengencer AndroMed[®] berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap viabilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi dan *recovery rate*. Persentase laktosa 0.4-0.6% menghasilkan viabilitas spermatozoa tertinggi, sedangkan Recovery rate tidak berbeda antara kontrol dengan penambahan sukrosa dan laktosa kecuali laktosa 0.8% yang menghasilkan nilai terendah.

Kata-kata kunci: Viabilitas spermatozoa, *recovery rate*, laktosa, sukrosa, pengencer,

Abstract

The aim of this study was to determine the effect of various concentrations of lactose and sucrose addition in AndroMed diluent on post-equilibration Simmental cattle spermatozoa viability and recovery rate. Completely randomized design (CRD) was used in this study with 7 treatment levels in the form of 0, 0.4, 0.6, 0.8% sucrose addition, 0.4, 0.6, 0.8% lactose addition in AndroMed diluent, each treatment was repeated 3 times. Cow semen was collected using an artificial vagina, immediately after collection the semen was diluted according to the treatment. Liquid semen is packaged in straws with a minimum number of spermatozoa of 25 million per straw. Semen equilibration was carried out for 2 hours at 5 oC, followed by pre-freezing, freezing, and thawing for 30 seconds at 37 oC. The parameters of this study were the characteristics of fresh semen, post-equilibration spermatozoa viability and recovery rate. The results showed that the addition of sucrose and lactose with different concentrations in AndroMed® diluent had a significant ($P < 0.05$) effect on spermatozoa viability after equilibration and recovery rate. The percentage of lactose 0.4-0.6% resulted in the highest spermatozoa viability, while the recovery rate did not differ between the controls with the addition of sucrose and lactose except for 0.8% lactose which produced the lowest value.

Keywords: Sperm viability, recovery rate, lactose, sucrose, Simmental, diluent

1 Pendahuluan

Inseminasi buatan (IB) adalah teknologi reproduksi yang dapat digunakan untuk meningkatkan populasi dan sekaligus mutu genetik sapi lokal Indonesia. Setiawan (2018), keuntungan IB pada sapi di Indonesia antara lain peningkatan mutu genetik yang lebih cepat karena menggunakan semen dari pejantan unggul, dapat menghemat biaya pemeliharaan pejantan lain dan penularan penyakit kelamin dari ternak yang diinseminasi dapat dibatasi atau dicegah. Sapi Simmental merupakan salah satu jenis sapi yang dipelihara sebagai pejantan unggul di Balai Inseminasi Buatan.

Spermatozoa sapi Simmental di balai inseminasi buatan diolah dengan teknologi kriopreservasi. Ciptadi (2012), kriopreservasi merupakan suatu metode penyimpanan sel gamet dalam waktu lama, relatif tidak terbatas, yang dilakukan dalam bentuk beku pada suhu -196°C yang biasanya dilakukan dalam container nitrogen cair, dalam medium yang sesuai untuk sel gamet dengan penambahan zat pelindung yang disebut krioprotektan. Kualitas spermatozoa *post-thawing* dapat dipengaruhi oleh jenis pengencer yang digunakan. Pengencer AndroMed adalah pengencer komersial yang umum digunakan di balai-balai inseminasi buatan di Indonesia. Pengencer andromed diketahui lebih baik dari pengencer lain berbahan dasar hewani seperti kuning telur (Susilawati, 2011).

Krioprotektan ekstraseluler biasanya mempunyai ukuran molekul besar sehingga tidak dapat menembus membran sel seperti karbohidrat, protein, lipoprotein, kuning telur, serum darah dan susu (Herdis dan Darmawan, 2012). Karbohidrat dapat berfungsi sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler sekaligus berperan sebagai substrat sumber energi, karbohidrat dari golongan disakarida terdiri atas unit monosakarida yang dapat dimetabolisme spermatozoa untuk menghasilkan adenosine triphosphate (ATP) sebagai sumber energi untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa (Labetubun dan Siwa, 2011). Salah satu jenis karbohidrat yang dapat digunakan sebagai krioprotektan adalah laktosa dan sukrosa. Laktosa dan sukrosa adalah jenis disakarida dengan dua monomer gula sederhana. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa disakarida lebih baik dalam melindungi spermatozoa babi jika dibandingkan monosakarida (Gómez-Fernández *et al.*, 2012)

Laktosa telah banyak digunakan sebagai tambahan pengencer dalam penelitian-penelitian sebelumnya yaitu pada spermatozoa kambing (Wayan Bebas *et al.*, 2018; Souhoka *et al.*, 2009; Tambing *et al.*, 2003), domba (Karja *et al.*, 2018; Mukherjee *et al.*, 2016), dan kerbau (Sianturi *et al.*, 2012). Pengencer tris sukrosa dilaporkan lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa rusa jika dibandingkan tris glukosa (Nalley *et al.*, 2011). Panyaboriban *et al.* (2015) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa domba *post-thawing* lebih tinggi dengan penggunaan sukrosa jika dibandingkan penggunaan glukosa. Ditambahkan oleh Thananurak *et al.* (2019) bahwa sukrosa lebih baik dalam meningkatkan kualitas dan fertilitas spermatozoa ayam yang dibekukan jika dibandingkan raffinosa. Hasil penelitian Herdis *et al.* (2019) menunjukkan bahwa penambahan sukrosa 0,4-0,6% dalam pengencer meningkatkan motilitas spermatozoa domba Garut *post-thawing*.

Namun laporan kaji banding penggunaan berbagai level sukrosa dengan laktosa pada pengencer semen sapi belum dilakukan sehingga penulis melakukan penelitian ini dengan harapan dapat meningkatkan kualitas spermatozoa sapi Simmental pada proses kriopreservasi. Dengan demikian, tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh penambahan laktosa dan sukrosa dalam pengencer AndroMed terhadap viabilitas spermatozoa sapi Simmental *post-ekuilibrasi* dan *recovery rate*.

2 Metodologi

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Produksi Semen, Unit Pelaksana Teknis Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen, Provinsi Sulawesi Selatan.

Metode Penelitian

Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rancangan acak lengkap (RAL), dengan 7 taraf perlakuan yang diulang sebanyak tiga kali. Taraf perlakuan yang digunakan yaitu kontrol (pengencer AndroMed), pengencer AndroMed + sukrosa 0,4%, pengencer AndroMed + sukrosa 0,6%, pengencer AndroMed + sukrosa 0,8%, pengencer AndroMed + laktosa 0,4%, pengencer AndroMed + laktosa 0,6%, pengencer AndroMed + laktosa 0,8% .

Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini adalah sebagai berikut:

Penyiapan pengencer, koleksi semen dan pengemasan semen

Pengencer yang digunakan adalah larutan AndroMed® (Minitube, Jerman) dengan perbandingan 1 bagian AndroMed® dan 4 bagian akuades. Metode koleksi semen yang digunakan adalah vagina buatan pada saat pejantan melakukan mounting. Semen yang diperoleh selanjutnya diencerkan dan ditambahkan sukrosa serta laktosa sesuai perlakuan. Pengemasan semen cair menggunakan *automatic filling & sealing machine* dengan konsentrasi spermatozoa pada masing-masing straw minimal 25 juta.

Tahap ekuilibrasi dan *Pre-freezing*

Ekuilibrasi dilakukan dengan menempatkan straw di atas rak dan didinginkan pada *refrigerator* suhu 5 °C selama 2 jam. Kemudian dilakukan *pre-freezing* dengan menempatkan *straw* di atas permukaan nitrogen cair sejauh ± 6 cm selama 15 menit.

Tahap *freezing* dan *thawing*

Freezing (pembekuan) dilakukan dengan merendam *straw* dalam nitrogen cair (suhu -196 °C). Selanjutnya, *thawing* dilakukan dengan merendam *straw* dalam air bersuhu 37 °C selama 30 detik.

Analisis Data

Uji Normalitas Shapiro wilk dilakukan untuk menguji normalitas data. Data yang berdistribusi normal dilanjutkan dengan analisis of covarian (ANOVA). Apabila terdapat pengaruh yang signifikan antar perlakuan maka dilakukan uji Jarak Berganda Duncan. Data ini dianalisis menggunakan aplikasi SPSS 16.

Peubah yang diamati

Evaluasi semen segar

Pengamatan semen segar secara makroskopis berupa volume, konsistensi, warna dan pH semen. Dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis yaitu motilitas dan konsentrasi spermatozoa menggunakan photometer SDM (*Minitube*). Abnormalitas spermatozoa diamati dengan menggunakan preparat apus spermatozoa yang telah dibuat menggunakan pewarnaan eosin-nigrosin kemudian diamati pada mikroskop perbesaran 40 x (Boeco, Jerman), kemudian dihitung dengan rumus :

$$\text{Abnormalitas spermatozoa (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{total spermatozoa}} \times 100$$

Viabilitas spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan setelah ekuilibrasi menggunakan metode pewarnaan eosin-nigrosin (Arifiantini, 2012). Pewarnaan dilakukan dengan mencampur semen dengan pewarna, kemudian dihomogenkan dan diapus tipis pada kaca preparat dan dikeringkan. Pengamatan spermatozoa hidup/mati dilakukan pada mikroskop (Boeco, Jerman) perbesaran 40 x. Rumus yang digunakan yaitu:

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Total spermatozoa}} \times 100$$

Recovery rate spermatozoa

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan setelah pengenceran dan setelah *thawing*. Penilaian dilakukan pada mikroskop cahaya pembesaran 40x secara subjektif dengan melihat keaktifan pergerakan spermatozoa. Rumus *Recovery rate* spermatozoa yang digunakan yaitu:

$$\text{Recovery rate (\%)} = \frac{\text{motilitas spermatozoa setelah pengenceran}}{\text{motilitas spermatozoa setelah thawing}} \times 100$$

3 Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Semen Sapi Simmental

Volume semen sapi Simmental pada penelitian ini 5.9 ml lebih rendah dari penelitian sebelumnya yaitu 6.19 ml (Sukirman *et al.*, 2019), 6.9-9.2 ml (Nyuwita *et al.*, 2015) dan 7 ml (Pratiwi *et al.*, 2015), namun mendekati beberapa penelitian lainnya yaitu 5.2-7.1 ml (Sholikhah *et al.*, 2021) dan 5.8-7.4 ml (Yanuarista *et al.*, 2022). pH semen yang diperoleh pada penelitian ini 6.4 sesuai dengan laporan sebelumnya oleh Nyuwita *et al.* (2015) dan Yanuarista *et al.* (2022). Konsentrasi spermatozoa 1.18 milyar/ml cukup konsisten dengan laporan sebelumnya yaitu 1.18-1.36 milyar (Sholikhah *et al.*, 2021) bahkan lebih tinggi dari laporan Susilowati *et al.* (2021) yaitu 1.03 milyar/ml, namun beberapa laporan menyatakan konsentrasi spermatozoa yang lebih tinggi yaitu 1.25-1.7 milyar/ml (Nyuwita *et al.*, 2015), 1.49-1.7 milyar/ml (Yanuarista *et al.*, 2022), dan 1.85 milyar/ml (Pratiwi *et al.*, 2015). Motilitas spermatozoa dalam penelitian ini 70% konsisten dengan laporan sebelumnya yaitu 69-71% (Yanuarista *et al.*, 2022) dan 66.3-72.1% (Nyuwita *et al.*, 2015), namun lebih rendah dari laporan Haris *et al.* (2020) yaitu 73.01%, Pratiwi *et al.* (2015) yaitu 75% dan laporan Sholikhah *et al.* (2021) yaitu 76.3-80.7%

Tabel 1. Karakteristik makroskopis dan mikroskopis semen sapi Simmental

Parameter	Rata-rata (SEM)
Volume semen (ml)	5.90±0.97
Konsistensi	kental
Warna	krem
Bau	khas
pH	6.4±0.00
Konsentrasi spermatozoa (10 ⁹ /ml)	1.18±0.20
Motilitas spermatozoa (%)	70±0.00
Abnormalitas spermatozoa (%)	5.66±0.16

Abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini 5.66% hampir sama dengan penelitian sebelumnya yaitu 5.25% (Susilowati *et al.*, 2021), hasil ini lebih baik dari laporan Menon *et al.* (2011) yaitu 20.64%, sedangkan Mentari *et al.* (2014) melaporkan abnormalitas spermatozoa yang lebih rendah yaitu 1.71-2.21% (Mentari *et al.*, 2014). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa spermatozoa yang tidak normal pada umumnya adalah pembengkokan pada bagian tengah (*mid piece*) yang menyebabkan ekor menyimpul (Gambar 1). Kelainan pada bagian tengah dalam penelitian ini umumnya tergolong distal *mid-piece reflex*. Hasil ini mendukung pernyataan sebelumnya bahwa abnormalitas yang umum ditemukan pada spermatozoa sapi setelah ejakulasi adalah *distal mid-piece reflex* (Menon *et al.*, 2011; Perry *et al.*, 2002). Gangguan pada proses termoregulasi testis, rendahnya kadar testosteron, paparan larutan hipotonik, *cold shock* atau faktor genetik dapat menyebabkan abnormalitas *distal mid-piece reflex* ini (McGowan *et al.*, 1995). Serupa dengan pernyataan Perry *et al.* (2021) bahwa abnormalitas ini dapat disebabkan spermatozoa berada dalam larutan hipotonik, *cold shock*, atau dalam larutan dengan pH di atas 7. Abnormalitas kategori *distal midpiece reflex* ini juga terbentuk ketika spermatozoa berada di dalam *cauda epididymis* selama 16 hari setelah sapi mengalami asidosis (Callaghan *et al.*, 2016).



Gambar 1. Abnormalitas spermatozoa yang diamati menggunakan mikroskop perbesaran 40x. Tanda panah menunjukkan abnormalitas pada bagian tengah (*distal mid-piece reflex*).

Viabilitas Spermatozoa Post Ekuilibrasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan penambahan karbohidrat dengan konsentrasi berbeda pada pengencer AndroMed® berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap viabilitas spermatozoa (Tabel 2). Perlakuan dengan penambahan laktosa 0.4-0.6% menghasilkan viabilitas lebih tinggi dari perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan laktosa sebagai disakarida mampu mempertahankan tekanan osmotik pengencer dan menjaga integritas membran plasma, serta memasok substrat energi untuk spermatozoa selama proses penyimpanan (Eriani *et al.*, 2017). Laktosa adalah salah satu komponen yang dapat bertindak sebagai anti *cold shock* dan juga berperan sebagai sumber energi (Bebas *et al.*, 2016). Laktosa merupakan karbohidrat golongan disakarida yang terdiri atas dua unit monosakarida, yakni satu unit glukosa dan satu unit galaktosa yang semuanya dapat dimetabolisme oleh spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa ATP untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa (Labetubun & Siwa, 2011).

Tabel 2 Viabilitas spermatozoa sapi Simmental post ekuilibrasi dengan penambahan sukrosa dan laktosa dalam pengencer AndroMed®

Perlakuan	Viabilitas (%)
Kontrol	76.16±0.71 ^b
Sukrosa 0.4%	79.68±1.29 ^c
Sukrosa 0.6%	78.37±2.05 ^{bc}
Sukrosa 0.8%	65.38±0.21 ^a
Laktosa 0.4%	80.32±1.56 ^{cd}
Laktosa 0.6%	82.71±2.57 ^d
Laktosa 0.8%	65.56±0.15 ^a

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Eriani *et al.* (2017) bahwa penambahan laktosa dalam pengencer mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa kerbau. Demikian juga dengan laporan Labetubun dan Siwa (2011) bahwa penambahan laktosa 0.6 g dalam pengencer tris-kuning telur meningkatkan viabilitas spermatozoa sapi Bali yang disimpan selama 3 hari. Viabilitas spermatozoa dalam penelitian ini menggunakan laktosa 0.4-0.6% hampir sama dengan penelitian Kowalczyk dan Piątkowska (2021) yaitu 79.09-80.11% pada spermatozoa sapi Simmental menggunakan pengencer BIOXcell. Namun lebih rendah dari laporan lainnya yaitu 87.11% dengan pengencer menggunakan Andromed (Pratiwi *et al.*, 2015)



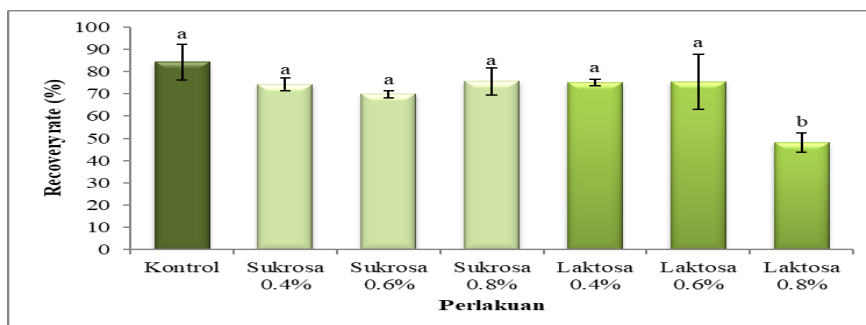
Gambar 2. Hasil pengamatan viabilitas spermatozoa menggunakan mikroskop perbesaran 40x. Tanda panah menunjukkan spermatozoa menyerap warna.

Peningkatan konsentrasi laktosa hingga 0.8% menurunkan viabilitas spermatozoa sapi peranakan Simmental setelah ekuilibrisasi. Konsentrasi laktosa yang terlalu tinggi cenderung merugikan spermatozoa selama penyimpanan. Hal ini juga terlihat pada laporan sebelumnya bahwa peningkatan level laktosa dalam pengencer meningkatkan osmolaritas dan menurunkan motilitas dan integritas membran spermatozoa unta Baktrian (Niasari-Naslaji *et al.*, 2006) dan peningkatan konsentrasi laktosa 30 mM-90 mM menurunkan viabilitas spermatozoa kambing Saanen (Tambing *et al.*, 2003).

Penggunaan sukrosa 0.4-0.6% mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa pada penelitian ini. Sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa Konsentrasi sukrosa 0.2-0.6 g/100 ml pengencer mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa domba Garut post-thawing (Herdis *et al.*, 2019). Penggunaan pengencer Andromed yang ditambahkan sukrosa 0.4% mampu meningkatkan viabilitas spermatozoa kerbau belang setelah penyimpanan 12 jam pada suhu 4 °C (Surachman *et al.*, 2009). Penggunaan sukrosa 4% dan laktosa 4% tidak menghasilkan perbedaan viabilitas spermatozoa. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa viabilitas spermatozoa domba post-ekuilibrisasi tidak berbeda antara penambahan sukrosa dengan laktosa pada konsentrasi 0.4 g/100 ml pengencer (Herdis *et al.*, 2016). Sukrosa dan laktosa adalah karbohidrat dari golongan disakarida yang efektif meningkatkan viabilitas spermatozoa pada sapi Simmental. Karbohidrat akan membantu menstabilkan membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer (Labetubun & Siwa, 2011)

Recovery Rate Spermatozoa

Recovery rate adalah kemampuan spermatozoa pulih setelah proses *freezing*. Daya motilitas spermatozoa yang hilang selama proses *freezing* berpengaruh terhadap *recovery rate* spermatozoa setelah *thawing* (Garner & Hafez, 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan penambahan karbohidrat dengan konsentrasi berbeda pada pengencer AndroMed® berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap *recovery rate* spermatozoa (Gambar 3). *Recovery rate* dalam penelitian ini dengan penambahan laktosa dan sukrosa menunjukkan nilai paling tinggi yaitu 69,8%-84,24%. Hasil penelitian ini lebih tinggi dibanding dengan penelitian Witayanto (2018) yaitu 59,70-62,25% dan penelitian Komariah *et al* (2014) yaitu 56,27% . Berdasarkan data ini, *Recovery rate* pada hasil penelitian ini layak untuk diinseminasikan karena sesuai standar nasional Indonesia (SNI). Menurut SNI *Recovery rate* minimal 50% untuk semen beku sapi (Badan Standardisasi Nasional, 2017).



Gambar 3 *Recovery rate* spermatozoa sapi Simmental dengan penambahan sukrosa dan laktosa dalam pengencer AndroMed®

Penambahan sukrosa 0.4-0.8% tidak menyebabkan perbedaan *recovery rate* dengan laktosa 0.4-0.6% dan kontrol. Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas total, progresif dan parameter gerak spermatozoa babi *post-thawing* yang ditambahkan sukrosa dan laktosa (Gómez-Fernández *et al.*, 2012). *Recovery rate* yang tinggi pada penelitian ini dibandingkan penelitian terdahulu diduga karena pengencer yang digunakan berbeda. Pengencer AndroMed® digunakan dalam penelitian ini. Menurut Susilawati (2011), AndroMed® merupakan bahan pengencer instan yang mengandung fruktosa, gliserol, asam sitrat, *buffer*, *phosfolipid*, *spectynomycine*, *lincomycine*, *tylocin*, dan *gentamycine*. Pengencer ini juga diakui lebih baik dibandingkan dengan pengencer tris kuning telur dan pengencer Triladyl™.

4 Kesimpulan

Penambahan sukrosa dan laktosa dalam pengencer AndroMed® mampu mempengaruhi viabilitas spermatozoa post ekuilibrase dan *recovery rate* spermatozoa sapi Simmental. Persentase laktosa 0.4-0.6% adalah perlakuan terbaik untuk digunakan dalam pengencer AndroMed.

5 Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Unit Pelaksana Teknis Pelayanan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan.

6 Daftar Pustaka

- Arifiantini, R. I. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. IPB Press, Bogor.
- Badan Standardisasi Nasional. 2017. *SNI 4869-1:2017 Semen beku – Bagian 1: Sapi*. BSN, Jakarta.
- Bebas, W., T. Pelayun, I. Damriyasa, dan I. Astawa. 2016. Lactose-astaxanthin Increases Green Jungle Fowl's Sperm Motility and Reduces Sperm DNA Fragmentation During 5° C Storage. *Bali Medical Journal* 4(3) : 152–156.
- Bebas, W., W. Gorda, I. G. N. B. Trilaksana, D. N. D. I. Laksmi, dan T. G. O. Pelayun. 2018. Lactose-Astaxanthin Increased the Frozen Semen Quality of Gembrong Goat in Conservation

- Efforts. *Jurnal Veteriner* 19(3) : 390–396.
- Callaghan, M. J., P. McAuliffe, R.J. Rodgers, J. Hernandez-Medrano, dan V.E.A. Perry. 2016. Subacute ruminal acidosis reduces sperm quality in beef bulls. *J Anim Sci* 94 : 3215–3228.
- Ciptadi, G. 2012. *Bioteknologi Sel Gamet dan Kloning Hewan*. UB Press, Malang.
- Eriani, K., N. Sari, R. Rosnizar, D. Dasrul, S. Suhartono, dan M. Rizal. 2017. Cryopreservation of Aceh Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Semen with Combination of Glycerol and Lactose. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education* 9(3) : 409–416.
- Garner, D. L., dan E. S. E. Hafez. 2000.. Spermatozoa and seminal plasma. Dalam E. S. E. Hafez dan B. Hafez (Eds.), *Reproduction in Farm Animals* (7th ed.). Lipincott Williams and Walkings, Philadelphia.
- Gómez-Fernández, J., E. Gómez-Izquierdo, C. Tomás, E. Mocé, dan E. De Mercado. 2012. Effect of Different Monosaccharides and Disaccharides on Boar Sperm Quality after Cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 133(1–2) : 109–116.
- Haris, F. Z., Y. S. Ondho, dan D. Samsudewa. 2020. Effect of Vitamin E Addition to Frozen Simmental Bull Semen Extender on Post-thawing Quality. *E3S Web of Conferences* 142: 1–6.
- Herdis, H., dan I. W. A. Darmawan. 2012. Pengaruh Maltosa sebagai Krioprotektan Ekstraseluler dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Guna Mendukung Keberhasilan Teknologi Inseminasi Buatan. *Jurnal Sains Dan Teknologi Indonesia* 14(3): 197–202.
- Herdis, H., I. W. A. Darmawan, dan M. Rizal. 2016. Penambahan Beberapa Jenis Gula dapat Meningkatkan Kualitas Spermatozoa Beku asal Epididimis Ternak Domba. *Jurnal Kedokteran Hewan* 10(2) : 200–204.
- Herdis, H., M. Surachman, dan I. W. A. Darmawan. 2019. The Role of Sucrose as Extracellular Cryoprotectant in Maintaining the Garut Rams ' Frozen Semen Quality. *International Conference on Biology and Applied Science (ICOBAS)*. AIP Conference Proceedings 2120(1): 080019.
- Karja, N. W. K., A. N., Prista, dan I. K. M. Andnyane. 2018. Effect of Different Type of Sugars on Post-Thawed Quality of Ram Spermatozoa. *Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology* 179–183.
- Komariah, K., R. I. Arifiantini, dan F. W. Nugraha. 2014. Kaji Banding Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental, Limousin, dan Friesian Holstein terhadap Proses Pembekuan. *Buletin Peternakan* 37(3) : 143–147.
- Kowalczyk, A., dan E. C. Piątkowska. 2021. Antioxidant Effect of Elamipretide on Bull's Sperm Cells During Freezing/Thawing Process. *Andrology* 9(4) : 1275–1281.
- Labetubun, J., dan I. P. Siwa. 2011. Kualitas Spermatozoa Kauda Epididimis Sapi Bali dengan Penambahan Laktosa atau Maltosa yang Dipreservasi pada Suhu 3–5 °C. *Jurnal Veteriner*, 12(3) : 200–207.
- McGowan, M. R., D. Galloway, E.G. Taylor, K. Entwistle, dan P. Johnston. 1995. *The Veterinary Examination of Bulls*. Australian Association of Cattle Veterinarians, Brisbane.
- Menon, A. G., H. W. Barkema, H. W., R. Wilde, J. P. Kastelic, dan J. C. Thundathil. 2011. Associations Between Sperm Abnormalities, Breed, Age, and Scrotal Circumference in Beef

- Bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research* 75(4) : 241–247.
- Mentari, F. K., Y. S. Ondho, dan S. Sutiyono. 2014. Pengaruh Umur terhadap Ukuran Epididimis, Abnormalitas Spermatozoa dan Volume Semen pada Sapi Simmental di Balai Inseminasi Buatan Ungaran. *Animal Agriculture Journal* 3(4) : 523–528.
- Mukherjee, K. P., S. Basu, A. K. Sahoo, U. Datta, K. Ray, dan S. Chattaraj. 2016. Cryoprotective Effect of EDTA, Lactose, Ascorbic Acid and L-cysteine as Additives on Garole Ram (Ovis aries) Semen. *International Journal of Advanced Reserch in Biological Sciences* 3(7) : 92–98.
- Nalley, W. M. M., R. Handarini, R. I. Arifiantini, T. L. Yusuf, B. Purwantara, dan G. Semiadi. 2011. Deer Frozen Semen Quality in Tris Sucrose and Tris Glucose Extender with Different Glycerol Concentrations. *Media Peternakan* 34(3) : 196–200.
- Niasari-Naslaji, A., S. Mosaferei, N. Bahmani, A. Abarghani, A. A. Gharahdaghi, A. Ghanbari, dan A. Gerami. 2006. Comparing Different Levels of Osmolality of Sucrose Extender on the Viability of Spermatozoa in Bactrian Camel (*Camelus bactrianus*). *Reproduction, Fertility and Development* 18(2) : 160.
- Nyuwita, A., T. Susilawati, dan N. Isnaini. 2015. Kualitas Semen Segar dan Produksi Semen Beku Sapi Simmental pada Umur yang Berbeda. *Ternak Tropika* 16(1) : 1–8.
- Panyaboriban, S., J. Suwimonteerabutr, dan N. Phutikanit. 2015. Effect of Various Combinations of Sugar Supplementation in The Extender on Frozen-Thawed Ram Semen Quality and Fertility. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 45(2) : 229–237.
- Perry, V. E. A. 2021. The Role of Sperm Morphology Standards in the Laboratory Assessment of Bull Fertility in Australia. *Frontiers in Veterinary Science* 8(672058).
- Perry, V. E., N. Phillips, G. Fordyce, B. Gardiner, K. Entwistle, P. Chenoweth, dan V. J. Doogan. 2002. Semen Collection and Evaluation. In G. Fordyce (Ed.), *Bull Fertility: Selection & Management in Australia*. Australian Association of Cattle Veterinarians, Brisbane.
- Pratiwi, R. I., S. Suharyati, dan M. Hartono. 2015. Analisis Kualitas Semen Beku Sapi Simmental Menggunakan Pengencer Andromed® dengan Variasi Waktu Pre Freezing. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 2(3) : 8–15.
- Setiawan, D. 2018. Artificial Insemination of Beef Cattle UPSUS SIWAB Program Based on the Calculation of Non-Return Rate, Service Per Conception and Calving Rate In The North Kayong Regency. *The International Journal of Tropical Veterinary and Biomedical Research* 3(1) : 7–11.
- Sholikhah, E. V., S. Sumartono, dan I. Dinasari. 2021. Analisis Kualitas Semen Segar Sapi Simmental pada Umur yang Berbeda. *Jurnal Dinamika Rekasatwa* 4(2) : 200–206.
- Sianturi, R. G., B. Purwantara, I. Supriatna, A. Amrozi, dan P. Situmorang. 2012. Pengaruh Glutation dan Penggantian Plasma Semen Kerbau dengan Plasma Semen Sapi terhadap Kualitas Semen Beku Kerbau Rawa (Bubalus bubalis). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 17(3) : 169–178.
- Souhoka, D. F., M. J. Matatula, W. M. Mesang-Nalley, dan M. Rizal. 2009. Laktosa Mempertahankan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah yang Dipreservasi dengan Plasma Semen Domba Priangan. *Jurnal Veteriner* 10(3) : 135–142.
- Sukirman, I., E. Sukmawati, S. D. Rasad, dan N. Solihati. 2019. The Influence of Breed and Type of

Extender on the Quality of Bull Semen. *Animal Production* 21(2) : 64–70.

Surachman, M., H. Herdis, Y. Yulnawati, M. Rizal, dan H. Maheshwari. 2009. Kualitas Semen Cair Asal Epididimis Kerbau Belang dalam Bahan Pengencer Andromed yang Mendapat Penambahan Sukrosa. *Media Peternakan* 32(2) : 88–94.

Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. UB Press, Malang.

Susilowati, S., T. Sardjito, I. Mustofa, O. S. Widodo, dan R. Kurnijasanti. 2021. Effect of Green Tea Extract in Extender of Simmental Bull Semen on Pregnancy Rate of Recipients. *Animal Bioscience* 34(2) : 198–204.

Tambing, S. N., I. Utama, dan R. I. Arifantini. 2003. Efektivitas Berbagai Konsentrasi Laktosa dalam Pengencer Tris terhadap Viabilitas Semen Cair Kambing Saanen. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 8(2) : 84–90.

Thananurak, P., N. Chuaychu-Noo, A. Th  lie, Y. Phasuk, T. Vongpralub, dan E. Blesbois. 2019. Sucrose Increases the Quality and Fertilizing Ability of Cryopreserved Chicken Sperms in Contrast to Raffinose. *Poultry Science* 98(9) : 4161–4171.

Witayanto, D. A. 2018. Perbandingan Kuantitas, Kualitas, dan Recovery Rate Semen Sapi Bali dan Sapi Simmental pada Umur yang Sama. *Skripsi*. Universitas Brawijaya, Malang.

Yanuarista, W., E. T. Setiatin, dan D. Samsudewa. 2022. Pengaruh Umur Pejantan Sapi Simmental terhadap Tingkah Laku Reproduksi, Kualitas Semen Segar dan Jumlah Produksi Semen Beku. *Livestock and Animal Research* 20(1) : 38–47.