PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGENCER SITRAT KUNING TELUR TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE SPERMATOZOA HIDUP DAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE

(Skripsi)

Oleh:

Sintha Pubiandara



JURUSAN PETERNAKAN FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS LAMPUNG BANDAR LAMPUNG 2016

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGENCER SITRAT KUNING TELUR TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE SPERMATOZOA HIDUP DAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE

Oleh

SINTHA PUBIANDARA

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Pelayanan Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung, Kecamatan Terbangi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung pada 19--20 Mei 2016. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah mengetahui pengaruh penambahan dosis rafinosa yang berbeda dan dosis rafinosa optimum yang terdapat dalam pengencer sitrat kuning telur yang dapat mempertahankan persentase motilitas, persentase hidup, dan persentase abnormalitas spermatozoa semen beku sapi Ongole. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 6 perlakuan dosis rafinosa (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%) dalam pengencer sitrat kuning telur dan masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1% kemudian untuk peubah yang berpengaruh nyata dilakukan uji polinomial ortogonal. Penambahan dosis rafinosa di dalam pengencer sitrat kuning telur tidak berbeda nyata (P>0,05) terhadap persentase motilitas ekuilibrasi, persentase motilitas prefreezing, persentase motilitas PTM, persentase spermatozoa hidup *prefreezing*, persentase spermatozoa hidup PTM, persentase abnormalitas ekuilibrasi, persentase abnormalitas *prefreezing*, dan persentase abnormalitas PTM. Penambahan dosis rafinosa di dalam sitrat kuning telur berbeda sangat nyata (P<0,01) terhadap persentase sermatozoa hidup pada ekuilibrasi berpola kuadratik dengan persamaan $\dot{Y} = 66,49+17,94x-4,23x^2$ dengan nilai optimum penambahan rafinosa 2,1%.

Kata kunci: Rafinosa, Sitrat Kuning Telur, Kualitas Semen, Sapi Ongole

PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGENCER SITRAT KUNING TELUR TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE SPERMATOZOA HIDUP DAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE

Oleh

Sintha Pubiandara

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar SARJANA PETERNAKAN

pada

Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Lampung



JURUSAN PETERNAKAN FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS LAMPUNG BANDAR LAMPUNG 2016 Judul Skripsi

: PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGENCER SITRAT KUNING TELUR TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE SPERMATOZOA HIDUP DAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE

Nama Mahasiswa

: Sintha Pubiandara

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1214141076

Jurusan

: Peternakan

Fakultas

: Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Sri Suharyati, S.Pt., M.P.

NIP 19680728 199402 2 002

drh. Madi Hartono, M.P. NIP 19660708 199203 1 004

Ketua Jurusan Peternakan

Sri Suharyati, S.Pt., M.P. NIP 19680728 199402 2 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua

: Sri Suharyati, S.Pt., M.P.

Percun

Sekretaris

: drh. Madi Hartono, M.P.

1919

Penguji

Bukan Pembimbing

: Siswanto, S.Pt., M.Si.

Dekan Fakultas Pertanian

Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.

MIP 19611020 198603 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 31 Agustus 2016

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Gunung Dempo pada 13 Maret 1995 sebagai anak pertama dari dua bersaudara, hasil buah cinta dari pasangan Bapak Rully dan Ibu Triani. Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-kanak (TK) pada tahun 2000 di TK Ikatan Kekeluargaan Ibu-Ibu (IKI) PTP. Nusantara VII (PERSERO) Unit Pagaralam; pendidikan Sekolah Dasar (SD) pada tahun 2006 di SD Negeri 43 Pagaralam; Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 6 Pagaralam pada 2009; Sekolah Menengah Atas Negeri 14 Bandar Lampung pada 2012. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada 2012, melalui Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Selama masa perkuliahan penulis pernah melaksanakan Praktik Umum di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, Bandung Jawa Barat Pada 2015, pada tahun 2016 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Panca Tunggal Jaya, Kecamatan Penawar Aji, Kabupaten Tulang Bawang, Provinsi Lampung.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif di kepengurusan Himpunan Mahasiswa Peternakan (HIMAPET) dan penulis juaga aktif dalam kegiatan Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Fakultas Pertanian sebagai Kepala Departemen Bidang Dana dan Usaha pada kepengurusan periode 2014--2015. Penulis pernah menjadi Asisten Dosen matakuliah Matematika pada tahun 2013/2014, Asisten Dosen

matakuliah Teknologi Reproduksi tahun 2014/2015 dan Asisten Dosen matakuliah Ilmu Kesehatan Ternak tahun 2015/2016.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	. viii
DAFTAR TABEL	. X
DAFTAR GAMBAR	. xii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang dan Masalah	. 1
B. Tujuan Penelitian	. 3
C. Kegunaan Penelitian	. 3
D. Kerangka Pemikiran	. 4
E. Hipotesis	. 7
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Sapi Ongole	. 8
B. Fisiologi Semen Sapi	. 9
C. Metabolisme Spermatozoa	. 11
D. Pengencer Semen	. 12
E. Sitrat Kuning Telur	. 13
F. Rafinosa	. 14
G. Kualitas Semen	. 19
1. Motilitas	. 19
2. Persentase hidup spermatozoa	. 21

	3. Abnormalitas	22
III. M	IETODE PENELITIAN	
A.	Tempat dan Waktu Penelitian	23
B.	Alat dan Bahan Penelitian	23
C.	Rancangan Penelitian	24
D.	Prosedur Penelitian	24
E.	Peubah Yang Diamati	33
F.	Analisis Data	33
IV. H	ASIL DAN PEMBAHASAN	
A.	Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi Ongole	34
B.	Pengaruh Rafinosa Terhadap Motilitas Spermatozoa	36
C.	Pengaruh Rafinosa terhadap Persentase Spermatozoa Hidup	40
D.	Pengaruh Rafinosa terhadap Persentase Abnormalitas Spermatozoa	46
V. Sl	IMPULAN DAN SARAN	
A.	Simpulan	49
B.	Saran	49
DAFT	'AR PUSTAKA	50
LAMI	PIRAN	

DAFTAR TABEL

rac	Del Ha	uaman
1.	Komposisi pengencer sitrat kuning telur	28
2.	Kualitas semen segar sapi Ongole	34
3.	Rataan persentase motilitas spermatozoa sapi Ongole	37
4.	Rataan persentase spermatozoa hidup sapi Ongole	41
5.	Rataan persentase abnormalitas spermatozoa sapi Ongole	47
6.	Motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi	55
7.	Motilitas spermatozoa setelah prefreezing	55
8.	Motilitas spermatozoa PTM	55
9.	Spermatozoa hidup setelah ekuilibrasi	56
10.	Spermatozoa hidup setelah <i>prefreezing</i>	56
11.	Spermatozoa hidup PTM	56
12.	Abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibrasi	57
13.	Abnormalitas spermatozoa setelah prefreezing	57
14.	Abnormalitas Spermatozoa PTM	57
15.	Hasil analisis ragam motilitas setelah ekuilibrasi	58
16.	Hasil analisis ragam motilitas setelah <i>prefreezing</i>	58
17.	Hasil analisis ragam motilitas PTM	58
18.	Hasil analisis ragam spermatozoa hidup setelah ekuilibrasi	58

19.	Hasil analisis ragam spermatozoa hidup setelah prefreezing	58
20.	Hasil analisis ragam spermatozoa hidup PTM	58
21.	Hasil analisis ragam abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibrasi	59
22.	Hasil analisis ragam abnormalitas spermatozoa setelah <i>prefreezing</i>	59
23.	Hasil analisis ragam abnormalitas spermatozoa PTM	59
24.	Hasil uii lanjut polinomial ortogonal	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar H	alaman
Bagan prosedur kerja pembuatan semen beku	. 25
2 . Bentuk spermatozoa hidup dan mati	. 40
3. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase spermatozoa hidup sapi Ongole setelah ekuilibrasi	. 43
4. Proses pembuatan pengencer sitrat kuning telur	. 60
5. Penampungan semen	. 60
6. Proses pencampuran semen dengan rafinosa	. 61
7. Printing straw	. 61

SANWACANA

Puji syukur kehadirat Allah SWT, berkat rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

- Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.-- selaku Dekan Fakultas
 Pertanian, Universitas Lampung -- atas izin yang telah diberikan;
- 2. Ibu Sri Suharyati, S.Pt., M.P.-- selaku Ketua Jurusan Peternakan, Universitas Lampung dan selaku Pembibing Utama -- atas izin, arahan, ketulusan hati, kesabaran dalam membimbing, memberikan arahan, motivasi dan ilmu yang terbaik yang telah diberikan oleh penulis;
- Bapak drh Madi Hartono, M.P.-- selaku Pembimbing Anggota -- atas bimbingan, kesabaran, arahan, motivasi serta nasehat yang dapat membangun diri penulis;
- 4. Bapak Siswanto, S.Pt., M.Si. -- selaku Pembahas -- atas bimbingan, kritik, saran dan arahan kepada penulis;
- Bapak drh. Purnama Edy Santosa, M.Si.-- selaku Dosen Pembimbing
 Akademik -- atas motivasi, nasehat, bimbingan, dan sarannya selama masa perkuliahan;

- Bapak/Ibu Dosen Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas
 Lampung --atas bimbingan, kesabaran, arahan dan nasihat selama menempuh pendidikan;
- Bapak Ir. Eko P. Widodo -- Selaku Kepala Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung -- atas izin, bantuan, dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian;
- 8. Bapak drh. Anwar, Ibu Murtiawan, S.Pt. Bapak Ir. Joko, Bapak Pur, Bapak Sarimin, Mas Yasir, Mas Tri, Mas Agung -- atas bimbingan dan sarannya selama penulis melaksanakan penelitian.
- 9. Dinas Peternakan Provinsi Lampung -- atas bantuan dan kerjasamanya
- Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung Tengah -- atas bantuan dan kerjasamanya
- 11. Ayahanda tercinta Rully dan Ibunda tercinta Triani yang sangat saya sayangi atas doa restu, motivasi, nasehat, dukangan baik moril maupun materil tak
 terhingga kepada penulis;
- 12. Hafizh Pubiando adik yang sangat saya sayangi -- atas semangat, dukungan, kesabaran, kasih sayang, motivasi yang selalu diberikan kepadaku;
- 13. Intan Ningtias, Wanda Elfandara, Azza, Embah, Bue, Bibik, Mamang, Pak De
 -- atas semangat, dukungan, kesabaran, kasih sayang, materil dan nasihat yang selalu diberikan kepadaku;
- 14. Iis Nurlia dan Indah Iftinandari Munzir -- selaku teman seperjuangan selama penelitian --atas kerjasama, kesabaran, pelajaran, kasih sayang, dukungan, pengertian dan persaudaraan semoga tetap bertahan;

- 15. Hindun Larasati, Anita Sari, Ertha Colanda Sari, Dwinta Amalia, Novia Rahmawati -- atas kesabaran, pengertian, perhatian, dukungan, kerjasama, pelajaran, kasih sayang dan persaudaraan semoga tetap bertahan;
- 16. Teman-teman angkatan 2012 (Juwita Indriya, Pione Firbarama, Rahmad
 Quanta, Benaya, Fadil, Naldo, Disa, Salamun, Hanan, Yogie, Tino, Renita,
 Meli, Apri, Marya, Pau, Rani, Ambi, Nandia, destama) dkk yang tidak dapat
 saya sebutkan namanya satu persatu dan teman-teman angkatan 13,14, dan 15
 -- atas kebaikan,support yang tiada henti, persaudaraan, bantuan, dan
 kerjasama yang telah diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat
 menyelesaikan skripsi;
- 17. Arief Darmawan dan Devi Pubiansari -- atas kesabaran, doa, motifasi, semangat, dukungan dan persaudaraan semoga tetap bertahan;
- 18. Teman-teman KKN 2016 Desa Penawar Aji -- Hikmah Asmara, Hasna Afifa, Ratih Puspita, Desindah Loria, Oka,dan Mahmud -- atas kebaikan, pengertian, support dan doa yang telah diberikan kepada penulis;
- 19. Saudara-saudara seperjuangan Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dan semua pihak yang namanya tidak tercantum yang turut membantu sejak dalam perkuliahan, penelitian dan sampai selesainya skripsi ini saya ucapkan terima kasih.

Bandar Lampung, Juni 2016

Penulis

Sintha Pubiandara



DENGAN MENYEBUT NAMA ALLAH YANG MAHA PENGASIH LAGI MAHA PENYAYANG

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala nikmat dan hidayah-Nya serta suri tauladanku Nabi Muhammad SAW yang selalu aku nantikan syafaatnya di Yaumil Akhir kelak

Ku persembahkan karya kecil ku ini kepada Ayah dan Ibu ku yang telah menjadi inspirasi dan motivasi tiada henti memberikan dukungan dan do'anya untuk ku.

Hadiah kasih kepada Adik ku dan keluarga besar ku atas dukungan selama aku menuntut ilmu

Ku persembahkan kepada para sahabatku yang senantiasa menjadi penyemangat dan menemani disetiap hariku. "Sahabat merupakan salah satu sumber kebahagiaan dikala kita merasa tidak bahagia."

Serta lembaga yang turut dan mendidik dan membangun diriku dalam hal berfikir dan bertindak

Almamater Hijau

" Sesungguhnya dibalik kesulitan selalu ada kemudahan" (Al Qur'an surat Al-Insyiraah 94:5 - 6)

The big or small the problem is depends on how we handle it!
(Sintha Pubiandara)

Entah akan berkarir atau menjadi ibu rumah tangga, seorang wanita wajib berpendidikan tinggi karena ia akan menjadi ibu. Ibu-ibu cerdas akan menghasilkan anak-anak cerdas (Dian Sastrowardoyo)

Never fear because allah always there beside you (Sintha Pubiandara)

"Berdoalah kepada-Ku, niscaya akan Kuperkenankan bagimu. (QS. Al Mu'min 40 : 60)

"Hai orang-orang yang beriman, Jadikanlah sabar dan shalatmu Sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar" (Al-Baqarah: 153)

If you fall a thousand times, stand up millions of time because yo do not know how close you are to success

Apa yang kamu tanam itu yang kamu tuai (Sintha Pubiandara)

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Sapi Ongole merupakan sapi yang berasal dari India dan diperhitungkan sebagai ternak tertua yang dijinakkan di dunia. Sapi Ongole masuk ke Indonesia pada tahun 1897, dikenal dengan nama sapi Benggala dan diternakkan secara intensif di Sumba (Burhan, 2003). Sapi Onggole memiliki banyak keunggulan dibandingkan dari jenis lain yaitu mampu bertahan terhadap panas serta endoparasit dan ektoparasit, mampu beradaptasi terhadap pakan yang jelek serta pertumbuhan yang relatif cepat dengan presentase karkas yang baik. Pertumbuhan sapi Ongole yang relatif cepat dapat membantu mempercepat peningkatan populasi sapi Ongole sehingga dapat memenuhi kebutuhan daging di Indonesia.

Meningkatkan populasi sapi Ongole harus diimbangi dengan perbaikan genetik yang dapat dilakukan dengan cara pemanfaatan teknologi reproduksi yaitu perkawinan suntik atau inseminasi buatan (IB) dengan semen beku. Semen beku yang digunakan untuk IB harus memiliki kualitas yang baik karena diambil dari pejantan unggul yang telah melalui seleksi terlebih dahulu.

Kualitas sperma tidak hanya dipengaruhi oleh bibit dari pejantan tetapi juga dipengaruhi oleh pengenceran semen. Pengenceran merupakan cara yang dapat dilakukan untuk mempertahankan kualitas dan volume sperma selama penyimpanan. Menurut Toelihere (1993), penggunaan bahan pengencer semen harus mempertahankan viabilits spermatozoa sebelum digunakan pada waktunya. Syarat bahan pengencer yang baik adalah harus dapat menyediakan nutrisi *buffer*, anti *cold shock*, antibiotik dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa dalam proses pendinginan dan pembekuan. Pengencer semen juga harus memungkinkan spermatozoa bergerak secara progresif, tidak bersifat racun terhadap spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*).

Pengencer yang sering digunakan untuk pengenceran semen adalah Tris-kuning telur, sitrat-kuning telur, susu segar-kuning telur, susu skim-kuning telur, AndroMed, dan laktosa-kuning telur. Sitrat kuning telur memiliki keunggulan yaitu mengandung lecitin dan lippoprotein yang dapat digunakan sebagai bahan penyangga (buffer) yang dapat mempertahankan dan mengatur pH semen juga mencegah terjadinya cold shock akibat penurunan temperatur yang mendadak. Pengencer sitrat kuning telur juga mengandung karbohidrat yang digunakan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi bagi spermatozoa. Penambahan karbohidrat dapat berfungsi sebagai nutrisi yang dapat digunakan oleh spermatozoa untuk melakukan aktivitas fisiologisnya sebelum spermatozoa dideposisikan ke alat kelamin betina.

Disakarida (trehalosa), trisakarida (rafinosa), dan oligosakarida merupakan karbohidrat dengan molekul besar. Penggunaan karbohidrat molekul besar pada

beberapa ternak diduga lebih mampu melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan (Yildiz *et al.*, 2000). Penambahan rafinosa pada pengencer semen dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama (Savitri *et al.*, 2014). Sampai saat ini belum dilakukan penelitian tentang penambahan dosis rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur sehinga dilakukan penelitian dengan menambahkan rafinosa.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

- 1. mengetahui pengaruh penambahan rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur dengan dosis (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%) terhadap motilitas, presentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa;
- mengetahui dosis optimum dari penambahan rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur terhadap motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa.

C. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat kepada petugas laboratorium di berbagai Balai Inseminasi Buatan mengenai dosis yang baik dari penambahan rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur sebagai bahan pengencer semen.

D. Kerangka Pemikiran

Semen adalah sekresi kelamin jantan dan epididimis serta kelenjar-kelnjar kelamin pelengkap yang terdiri dari spermatozoa dan plasma semen yang secara normal diejakulasi ke dalam saluran kelamin betina pada saat kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan (Toelihere, 1985).

Sapi Ongole merupakan sapi yang berasal dari India yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai sapi potong karena sapi Ongole memiliki beberapa keunggulan diantaranya adalah mampu bertahan terhadap panas serta endoparasit dan ektoparasit, mampu beradaptasi terhadap pakan yang jelek serta pertumbuhan yang relatif cepat dengan presentase karkas yang baik. Sapi Ongole dapat dimanfaatkan sebagai pejantan yang dapat diambil semennya kemudian dibekukan untuk keperluan inseminasi buatan dan memperpanjang masa simpan semen.

Inseminasi Buatan merupakan proses teknologi reproduksi yang dilakukan untuk meningkatkan mutu kualitas sapi, meningkatkan efisiensi waktu dalam kebuntingan dan mempercepat peningkatan populasi. Berhasilnya suatu program kegiatan IB pada ternak tidak hanya tergantung pada kualitas dan kuantitas semen yang diejakulasikan seekor pejantan tetapi tergantung juga kepada kesanggupan untuk mempertahankan kualitas dan memperbanyak volume semen tersebut untuk beberapa saat lebih lama setelah ejakulasi sehingga lebih banyak betina yang akan diinseminasi.

Berdasarkan karakteristik semen tersebut maka untuk mempertahankan kualitas semen dalam jangka waktu yang lama perlu dilakukan pengenceran semen. Pengenceran semen bertujuan untuk meningkatkan volume dan tidak menurunkan kualitas semen tersebut. Toelihere (1993) menyatakan bahwa penggunaan bahan pengencer semen harus dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa sebelum digunakan pada waktunya. Syarat bahan pengencer adalah harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, harus memungkinkan spermatozoa dapat bergerak secara progresif, tidak bersifat racun bagi spermatozoa, menjadi penyangga bagi spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (cold shock).

Penggunaan bahan pengencer pada semen harus dapat memenuhi fungsi dan syarat bahan pengencer agar tidak terjadi kerusakan sel yang dapat menurunkan kualitas dari semen tersebut. Salah satu komponen yang harus ditambahkan ke dalam bahan pengencer adalah bahan yang bersifat sebagai krioprotektan (Toelihere, 1993).

Krioprotektan terdiri atas dua macam, yaitu krioprotektan intraseluler dan krioprotektan ekstraseluler. Bahan pengencer krioprotektan intraseluler terutama digunakan untuk proses pembekuan semen. Krioprotektan intraseluler contohnya adalah gliserol dan etilen glikol. Krioprotektan ekstraseluler masing-masing mempunyai karakteristik yang spesifik. contohnya adalah kuning telur, susu sapi segar dan susu skim.

Menurut Toelihere (1985), penggunaan sitrat kuning telur sebagai bahan pengencer dapat mempertahankan kualitas dan meningkatkan volume semen sehingga pada saat digunakan untuk IB presentase kebuntingan akan lebih tinggi. Sitrat kuning telur mengandung lipoprotein dan lechitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa dan mencegah *cold shock*. Sitrat kuning telur mengandung *buffer* yang dapat mempertahankan dan mengatur pH.

Rafinosa adalah suatu trisakarida yang penting, terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan, yaitu galaktosa-glukosa-fruktosa. Menurut Rizal *et al.*, (2006) ,penambahan dextrosa, rafinosa, trehalosa, atau sukrosa dengan taraf 0,4% di dalam pengencer tris efektif meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Lebih lanjut BBIB Singosari (2008), penambahan dosis rafinosa sebesar 2,5% dalam pengencer tris kuning telur berfungsi sebagai krioprotektan.

Penambahan sumber energi seperti penambahan rafinosa pada pengencer semen dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama (Savitri *et al.*, 2014). Penggunaan dosis rafinosa yang efektif pada pengencer sitrat kuning telur dapat meningkatkan kualitas spermatozoa, oleh karena itu perlu dilakukan modifikasi dosis rafinosa yang ditambahkan pada pengencer sitrat kuning telur agar dapat mengetahui dosis terbaik yang dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Berdasarkan hal-hal tersebut diatas maka penggunaan dosis rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur dengan taraf (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%) diharapkan dapat mempertahankan kualitas semen sapi Ongole. Dosis rafinosa yang efektif dapat menyediakan energi

yang dibutuhkan oleh spematozoa dalam jumlah yang lebih banyak sehingga dapat mempertahankan hidup spermatozoa lebih lama.

E. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- terdapat pengaruh penambahan rafinosa pada pengencer sitrat kuning telur terhadap motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa pada semen sapi Ongole;
- terdapat salah satu dosis rafinosa pada sitrat kuning telur optimum mempertahankan motilitas, persentae hidup, dan abnormalitas spermatozoa pada semen sapi Ongole.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sapi Ongole

Bangsa sapi Ongole memiliki klasifikasi taksonomi menurut Blakely dan Bade (1992), sebagai berikut :

Phylum: Chordata

Sub-phylum : Vertebrata

Class: Mamalia

Ordo: Artiodactyla

Sub-ordo: Ruminantia

Family: Bovidae

Genus: Bos

Species: Bos indicus.

Sapi Ongole berasal dari India dan diperhitungkan sebagai ternak yang dijinakkan yang tertua di dunia. Sapi ongole masuk ke Amerika pada awal tahun 1984, disilangkan dan menghasilkan keturunan sapi yang lebih besar, cepat tumbuh dan mudah perawatannya. Di Belanda sapi Onggole dikenal sebagai sapi zebu. Sapi

Ongole masuk ke Indonesia pada tahun 1897, dikenal dengan nama sapi Benggala dan diternakkan secara intensif di Sumba (Burhan, 2003).

Pada tahun 1917, untuk pertama kali sapi Ongole dikeluarkan dari Pulau Sumba dengan tujuan Sulawesi Utara, Kalimantan dan Jawa. Namun sebenarnya untuk Pulau Jawa dan Sumatera, pemasukan sapi Ongole sudah dimulai sejak tahun 1909 dalam rangka 'ongolisasi' sapi-sapi yang ada di kawasan barat Indonesia (Siregar, 2008).

Menurut Siregar (2008) sapi Onggole memiliki warna tubuh putih sedikit keabuan, terdapat gelambir dari rahang bawah hingga ujung dada depan, badan besar, panjang, dan berpunuk di atas bahu. Kepala panjang, telinga kecil dan tegak. Paha besar, kulit tebal dan lepas. Temperamen tenang dengan mata besar, tanduk pendek dan hampir tidak terlihat. Sapi Onggole mampu bertahan terhadap panas serta endoparasit dan ektoparasit. Mampu beradaptasi terhadap pakan yang jelek, mampu bertahan pada suhu tinggi (40°C) pertumbuhan yang relatif cepat dengan presentase karkas yang baik. Tinggi sapi jantan dapat mencapai 150 cm dengan bobot badan 600--750 kg, sedangkan betina dewasa dapat mencapai tinggi badan 135cm dengan bobot badan 450--600 kg. Pertambahan bobot badan harian dapat mencapai 0,75 Kg dan persentase karkas sekitar 58%.

B. Fisiologi Semen Sapi

Menurut Toelihere (1985), semen adalah sekresi kelamin jantan dan epididimis serta kelenjar-kelnjar kelamin pelengkap (kelenjar vesikularis) yang terdiri dari spermatozoa dan plasma semen yang secara normal diejakulasi kedlam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi, tetapi dapat pula ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan. Spermatozoa adalah sel kelamin (gamet) yang diproduksi di dalam testis melalui proses spermatogenesis, yang bersama—sama dengan plasma semen akan dikeluarkan melalui saluran kelamin jantan untuk membuahi sel telur.

Menurut Evans dan Maxwell (1987), plasma semen adalah sarana transportasi saat melewati saluran reproduksi jantan ketika ejakulasi, mengaktifkan medium untuk sperma non motil, dan sebagai bahan penyangga yang kaya kandungan nutrisi serta berperan membantu sperma tetap hidup setelah dipindahkan kedalam saluran kelamin betina.

Menurut Toelihere (1985), komponen yang terpenting dari semen adalah spermatozoa karena mempunyai fungsi utama dalam pembuahan ovum. Plasma semen berfungsi sebagai medium pembawa sperma dari saluran reproduksi jantan kedalam saluran reproduksi betina. Setiap hewan memiliki sifat-sifat semen yang berbeda-beda, perbedaan tersebut terletak pada volume, kekentalan, pH, konsentrasi, warna dan baunya.

Garner dan Hafez (1993) menyatakan bahwa spermatozoa normal terdiri dari kepala dan ekor, kepala berbentuk oval maemanjang lebar dan datar, berisi materi inti dan kromosom DNA yang bersenyawa protein untuk membawa informasi genetik.

C. Metabolisme Spermatozoa

Menurut Mann (1964), reaksi yang menghasilkan energi di dalam semen hanya berlangsung pada spermatozoa. Menurut Toelihere (1985), energi untuk motilitas spermatozoa berasal dari perombakan *Adenosin Triphosphat* (ATP) di dalam selubung mitokondria melalui reaksi-reaksi penguraiannya menjadi *Adenosin Diphosphat* (ADP) dan *Adenosin Monophosphat* (AMP). *Adenosin Triphosphat* (ATP) adalah energi yang diperlukan sebagai sumber energi bagi sel spermatozoa, ATP akan di konversikan menjadi ADP yang menghasilkan 7.000 kalori per mol energi.

Dalam keadaan normal energi yang dilepaskan dapat dipakai sebagai energi mekanik (pergerakan) atau sebagai energi kimiawi (biosintesa), jika tidak dipergunakan sewaktu dilepaskan, ia akan menghilang sebagai panas.

Apabila pemberian energi berupa senyawa phosphor (P~P) di dalam ATP dan ADP habis, maka kontraksi fibril-fibril spermatozoa akan terhenti dan spermatozoa tidak bergerak. Untuk melangsungkan pergerakan spermatozoa ATP dan ADP harus dibangun kembali, untuk membangun ATP dari ADP, atau ADP dari AMP dengan penambahan gugusan *phosphoryl*, diperlukan sumber energi dari luar.

Dalam kebanyakan aktivitas fisiologik, sumber energi tersebut didapatkan dari hidrat arang atau lemak. Ditemukan empat bahan organik di dalam semen yang dapat dipakai secara langsung atau tidak langsung oleh spermatozoa sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitasnya. Bahan-bahan tersebut adalah fruktosa,

sorbitol, GPC dan plasmalogen. Dalam pengaplikasiannya, keempat bahan tersebut dapat digunakan secara langsung apabila tersedia oksigen yang secara normal terdapat dalam semua bagian saluran kelamin betina.

D. Pengencer Semen

Menurut Salisbury dan Van Denmark (1985), dengan IB, seekor pejantan dapat melayani 5.000 sampai 10.000 ekor sapi betina per tahun, sedangkan dengan perkawinan alam hanya dapat melayani 50 sampai 70 ekor sapi betina per tahun. Penggunaan teknik IB berkaitan erat dengan proses pengenceran. Meskipun volume ejakulasi dapat dipergunakan untuk melaksanakan inseminasi lebih dari satu ekor betina, penemuan bahan pengencer yang sesuai dengan kebutuhan telah memungkinkan pemanfaatan secara meluas mengenai Inseminasi Buatan.

Menurut Herdis dan Kusuma (2003), pengencer yang sering digunakan untuk pengenceran semen adalah Tris-kuning telur, sitrat-kuning telur, susu segar-kuning telur, susu skim-kuning telur, AndroMed, dan laktosa-kuning telur.

Menurut Yulnawati dan Herdis (2009), bahwa karbohidrat yang terkandung di dalam bahan pengencer mempunyai beberapa fungsi yaitu sebagai sumber energi, mengatur tekanan osmotik dan sebagai krioprotektan ekstraseluler.

Menurut Arifiantini dan Yusuf (2006), bahan pengencer yang mengandung kuning telur, susu skim dan susu sapi segar dapat melindungi spermatozoa selama proses pendinginan dan pembekuan. Untuk menghasilkan semen beku yang berkualitas

tinggi dibutuhkan bahan pengencer seperti *buffer* dan krioprotektan yang dapat melindungi dan mempertahankan kualitas spermatozoa selama proses pendinginan, pembekuan dan *thawing*. Kuning telur mengandung lipoprotein dan lecithin yang berfungsi untuk mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa.

Menurut Kayser *et al.*, dalam Rizal dan Herdis (2008), untuk meminimalkan kerusakan sel dapat dilakukan dengan menambahkan zat tertentu ke dalam pengencer semen. Salah satu komponen yang dapat ditambahkan ke dalam bahan pengencer adalah krioprotektan. Krioprotektan terdiri atas dua macam, yaitu krioprotektan intraseluler dan krioprotektan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler contohnya adalah gliserol dan etilen glikol. Sedangkan ekstraseluler contohnya adalah kuning telur, susu sapi segar dan susu skim.

E. Sitrat Kuning Telur

Sitrat kuning telur mengandung lecitin dan lippoprotein yang dapat digunakan sebagai bahan penyangga (*buffer*) semen dan mencegah terjadinya *cold shock* akibat penurunan temperatur yang mendadak (Trias, 2001). Lebih lanjut Junianto *et al.*, (2000), menyatakan bahwa kuning telur mengandung glukosa yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi spermatozoa.

Meurut Evans dan Maxwell yang dikutip Siregar dan Hamdan (2004), di dalam sitrat kuning telur terdapat *buffer* yang dapat mempertahankan dan mengatur pH. Sistem

buffer ini berperan melindungi spermatozoa dari perubahan pH yang tiba-tiba, yang dapat merusak daya hidup sel spermatozoa.

Menurut Paulenz et al., (2003) penambahan kuning telur yang berisi fosfolipid dan lesitin ke dalam pengencer, dapat melindungi membran spermatozoa terhadap kejutan dingin. Lebih lanjut Morel, (1999) kerusakan spermatozoa pada saat preservasi yang disebabkan oleh efek cold shock mengubah membran spermatozoa dari konfigurasi normal ke konfigurasi heksagonal yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma spermatozoa ketika membran spermatozoa mengalami kerusakan, enzim aspartat aminotransferase (AspAT) yang merupakan enzim utama dalam mitokondria yang memproduksi ATP akan dilepaskan dari sel dan masuk ke seminal plasma. Menurut Colenbrander et al., 1992; Arifiantini dan Purwantara, (2010) kehilangan AspAT akan mengganggu produksi ATP dan mengganggu motilitas spermatozoa.

F. Rafinosa

Rafinosa adalah suatu trisakarida yang penting, terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan yaitu galaktosa-glukosa-fruktosa. Atom karbon 1 pada galaktosa berikatan dengan atom karbon 6 pada glukosa, selanjutnya atom karbon 1 pada glukosa berikatan dengan atom karbon 2 pada fruktosa. Apabila dihidrolisis sempurna, rafinosa akan menghasilkan galaktosa, glukosa dan fruktosa.

Karbohidrat dapat berfungsi sebagai sumber energi seperti glukosa dan fruktosa, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Souhoka *et al.*, 2009). Trehalosa (disakarida) terdiri dari dua molekul

glukosa, sedangkan rafinosa (trisakarida) terdiri dari masing-masing satu molekul glukosa, fruktosa, dan galaktosa. Trehalosa dan rafinosa dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama.

Menurut Viswanath dan Shannon (2000), krioprotektan golongan karbohidrat memiliki kemampuan menggantikan molekul air secara normal dalam kelompok polar *hydrated*. Sifat-sifat senyawa karbohidrat tersebut membantu meningkatkan stabilitas membran plasma sel spermatozoa selama masa transisi melewati zona suhu yang kritis, serta mengubah sifat mekanik pengencer melalui peningkatan viskositas.

Rafinosa terdiri dari tiga sakarida yang mempunyai peranan penting pada penyesuaian pengaruh tekanan osmotik. Aktivitas dan sumber energi sakarida dengan bobot molekul yang tinggi sangat baik untuk gerakan spermatozoa. Sebagai sumber aktivitas rafinosa yang terdiri dari D-galaktosa, Dglukosa, dan D-Fruktosa juga berfungsi menstabilkan kualitas spermatozoa terhadap pengaruh buruk penyimpanan dan pembekuan dalam nitrogen N2 cair (Fernández *et al.*, 2007).

Karbohidrat molekul besar dapat menyediakan energi dalam jumlah yang cukup banyak yang diperlukan untuk metabolisme dan fisiologi secara normal, namun tidak dapat melewati membran plasma spematozoa (Naing *et al.*, 2010).

Rafinosa yang ditambahkan ke dalam pengencer akan berasosiasi dengan karbohidrat yang ada pada selubung sel sehingga membran plasma dapat terlindungi dari kerusakan secara mekanik selama proses pengolahan semen berlangsung, terutama

saat penyimpanan pada suhu rendah. Kalaupun karbohidrat yang ada pada membran plasma sel tersebut rusak selama proses preservasi, diharapkan rafinosa yang ditambahkan dapat menjadi pengganti sehingga struktur selubung sel tetap utuh (Savitri *et al.*, 2014).

Rafinosa dapat melindungi membran plasma spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin selama penyimpanan pada suhu rendah (5°C). Kejutan dingin tersebut berkaitan dengan perubahan fosfolipid yang menyusun membran plasma dan perubahan tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada membran plasma sehingga ion-ion seperti kalsium bebas masuk ke dalam sel (Savitri *et al.*, 2014).

Menurut Rizal *et al.*, (2006) ,penambahan dextrosa, rafinosa, trehalosa, atau sukrosa dengan taraf 0,4% di dalam pengencer tris efektif meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Lebih lanjut BBIB Singosari (2008), penambahan dosis rafinosa sebesar 2,5% dalam pengencer tris kuning telur berfungsi sebagai krioprotektan.

Menurut Rizal *et al.*,(2006), menunjukkan bahwa adanya perbaikan kualitas semen beku dengan penambahan berbagai jenis gula seperti rafinosa di dalam pengencer menjadi indikator bahwa gula-gula tersebut efektif melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses kriopreservasi semen. Gula yang ditambahkan berfungsi sebagai substrat sumber energi dan sekaligus sebagai krioprotektan ekstraseluler. Sebagai substrat sumber energi, gula tersebut akan dimetabolisir melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam trikarboksilat (siklus Krebs), sehingga dihasilkan energi berupa ATP yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam

pergerakan (motilitas). Sebagai krioprotektan ekstraseluler, gula akan melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan secara mekanik yang terjadi saat proses kriopreservasi semen. Hal ini ditandai dengan lebih tingginya nilai persentase membran plasma utuh (MPU) semen beku perlakuan penambahan gula dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Menurut Salamon dan Maxwell (2000), gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (glass) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel spermatozoa secara mekanik. Gula dapat melindungi membran plasma sel spermatozoa karena pada bagian luar membran plasma sel terdapat karbohidrat yang berikatan dengan lipid (glikolipid) atau protein (glikoprotein) yang disebut selubung sel atau glikokaliks (Subowo, 1995).

Krystalia (2013) menyatakan bahwa rafinosa adalah suatu trisakarida yang penting, terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan, yaitu fruktosa-glukosa-galaktosa. Setelah dihidrolisi sempurna, gugus gula yang pertama digunakan oleh spermatozoa adalah fruktosa. Fruktosa dalam sel difosforilasi oleh heksokinase atau fruktokinase yang akhirnya menjadi fruktosa 1 fosfat. Lalu akan dipecah menjadi DHAP (dihidroksiasetonfosfat) dan Gliseraldehid oleh aldolase B. DHAP dapat secara langsung masuk ke glikolisis dan glukoneogenesis di dalam sel. Pembentukan sorbitol berubah menjadi fruktosa di dalam sel sperma oleh enzim sorbitol dehidrogenase dan inilah sumber energi sperma. Sorbitol tidak seperti glukosa, sorbitol tidak bisa melewati membran sel akibatnya sorbitol terjebak didalam sel. Ini

menyebabkan efek osmotik meningkat, sorbitol menarik air sehingga terjadi pembengkakan dan menyebabkan kematian spermatozoa.

Metabolisme glukosa didalam sel yaitu glukosa mengalami fosforilasi oleh suatu heksokinase menjadi glukosa 6-fosfat. Glukosa 6-fosfat kemudian dapat masuk ke sejumlah jalur metabolik. Tiga jalur yang biasa terdapat pada semua jenis sel adalah glikolisis, jalur pentosa fosfat, dan sintesis glikogen. Di dalam jaringan, fruktosa dan gataktosa diubah menjadi zat antara metabolisme glukosa. Dengan demikian, nasib gula-gula ini sejajar dengan nasib yang dialami oleh glukosa. Metabolisme utama glukosa 6-fosfat adalah oksidasi melalui jalur glikolisis, yang merupakan sumber ATP untuk semua jenis sel. Sel yang tidak memiliki mitokondria tidak dapat mengoksidasi bahan bakar lain. Sel tersebut menghasilkan ATP dari glikolisis anaerobik (perubahan glukosa menjadi laktat). Sel yang memiliki mitokondria mengoksidasi glukosa menjadi CO2 dan H2O melalui glikolisis dan siklus asam trikarboksilat (Krystalia, 2013).

Metabolisme galaktosa menggunakan enzim galaktokinase yang mengkatalisis dalam glikolisi dan dalam reaksi ini diperlukan ATP sebagai donor fosfat. Galaktosa 1-fosfat yang terbentuk akan bereaksi dengan uridin difosfat glukosa (UDPG) dan menghasilkan uridin difosfat galaktosa dan glukosa 1-fosfat. Reaksi ini dikatalisis enzim galaktosa 1-fosfat uridil transferase, galaktosa menggantikan tempat glukosa. Perubahan galaktosa menjadi glukosa ini terjadi pada suatu nukleotida yang mengandung galaktosa, peristiwa oksidasi-reduksi berlangsung dan memerlukan NAD⁺ sebagai ko-enzim. UDP-glukosa yang dihasilkan, dibebaskan dalam bentuk

glukosa 1-fosfat, sebelum UDP-glukosa yang dihasilkan dibebaskan digabung dulu dengan molekul glikogen, baru kemudian dipecah enzim fosforilase (Krystalia, 2013).

G. Kualitas Semen

Menurut Hafez (1987), daya tahan hidup sperma yang dimaksud adalah kemampuan sperma untuk bertahan hidup selama penyimpanan yang diperlihatkan melalui sanggupnya bergerak sampai tidak adanya pergerakan lagi. Daya tahan hidup sperma adalah kemampuan sperma untuk bertahan hidup selama motilitas spermatozoanya masih berada diatas motilitas sperma layak IB, yakni minimal 40 %. Sedangkan persentase hidup dibawa 40 % tidak lagi dilakukan pengamatan.

Menurut Puka (1996), sperma dalam semen cair sapi Brangus dalam pengencer sitrat kuning telur dapat bertahan hidup hingga 11,75 hari sesudah pengenceran, kemudian diikuti susu skim kuning telur selama 9,00 hari. Meskipun demikian pengamatan yang efektif dan efisien hanya sampai pada waktu spermatozoa yang dipertahankan dalam bahan pengencer tersebut masih berada pada motilitas layak IB, yakni minimal 40 % dan hal ini hanya dicapai pada penyimpanan yang tidak lebih dari 4 hari setelah diencerkan.

1. Motilitas

Menurut Arifiantini *et al.*,(2005), motilitas adalah gerak maju ke depan dari spermatozoa secara progresif. Oleh karena tujuan akhir dari pengencer adalah untuk

kegiatan inseminasi buatan maka daya gerak spermatozoa secara progresif (maju kedepan) menjadi patokan yang mutlak diperhitungkan. Hal ini berarti sperma yang bergerak berputar-putar atau bergerak di tempat apalagi yang tidak bergerak tidak dijadikan tolok ukur penilaian kualitas semen beku atau semen cair. Artinya parameter motilitas disamping konsentarsi sperma merupakan parameter utama dalam menilai kelayakan semen yang akan digunakan dalam kegiatan IB.

Menurut Salisbury dan Van Denmark (1985) sesuai dengan bentuk morfologi spermatozoa dan pola metaboliknya yang khusus dengan dasar produksi energi spermatozoa hidup dapat mendorong dirinya sendiri maju ke depan di dalam lingkungan zat cair. Motilitas telah sejak lama dikenal sebagai alat untuk memindahkan spermatozoa melalui saluran reproduksi hewan betina. Transport kilat spermatozoa dari serviks ke infundibulum terjadi secara otomatik (meski pada spermatozoa tidak motil) karena rangsangan oxitocyn, terhadap konsentrasi saluran reproduksi.

Toelihere (1985) menyatakan bahwa motilitas sperma cair yang akan dibekukan adalah 70%. Semen yang layak diguanakn untuk IB adalah minimal 40% sesuai dengan Standar *Post Thawing Motility* (PTM).

Lindsay *et al.*,(1982) menyatakan standar minimum semen sapi jantan yang dikoleksikan dengan vagina buatan dan dipakai untuk Inseminasi Buatan memiliki persentase motil 50%. Menurut Masuda (1992) motilitas tergantung pada spesies hewan, temperatur dan plasma semen. Sperma sapi jantan bergerak normal ke depan

pada temperatur 37--38°C, gerakan akan berhenti dan metabolisme sangat lambat pada 5°C dan pada 54--56°C akan mati. Perubahan suhu secara cepat sangat berbahaya bagi sperma (*shock* temperatur).

2. Persentase Hidup Spermatozoa

Menurut Mulyono (1998), sperma yang hidup dapat diketahui dengan pengecatan atau pewarnaan dengan menggunakan eosin. Eosin dapat dibuat dari serbuk eosin yang dilarutkan dalam aquadest dengan konsentrasi 1 : 9. Kemudian sperma ditetesi dengan larutan eosin dan diratakan, kemudian di angin-anginkan atau di fiksasi dengan menggunakan spiritus, setelah itu dilihat di bawah mikroskop. Sperma yang tercat atau berwarna merah berarti sperma itu mati, sedangkan yang tidak terwarnai atau tidak tercat berarti sperma itu hidup. Lebih lanjut Toelihere (1985), standar persentase sel hidup sperma beku yang baik yaitu >50% .

Menurut Hafez (1987) perbedaan afinitas zat warna antara sel-sel sperma yang mati dan yang hidup digunakan untuk melindungi jumlah sperma hidup secara objektif pada waktu semen segar dicampur dengan zat warna (eosin 2%). Sel-sel sperma yang hidup tidak atau sedikit sekali menghisap warna sedangkan yang mati akan mengambil warna karena permeabilitas dinding meningkat sewaktu mati. Tujuan pewarnaan diferensial adalah untuk mengetahui persentase sel-sel sperma yang mati dan yang hidup.

3. Abnormalitas

Menurut Toelihere (1985), mengklasifikasikan abnormalitas dalam abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer meliputi kepala yang terlampau besar (macrocephlalic), kepala terlampau kecil (microcephalic), kepala pendek melebar, pipih memanjang dan piriformis; kepala rangkap, ekor ganda; 25 bagian tengah melipat, membengkok, membesar, piriformis; atau bertaut abaxial pada pangkal kepala; dan ekor melingkar, putus atau terbelah. Abnormalitas sekunder termasuk ekor yang putus, kepala tanpa ekor, bagian tengah yang melipat, adanya butiranbutiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosom yang terlepas. Menurut Bretzlaff (1995), persentase abnormalitas spermatozoa semen segar yang baik untuk inseminasi buatan tidak lebih dari 20%. Kemudian ditambahkan oleh Toelihere (1993) setiap spermatozoa yang abnormal tidak dapat membuahi sel telur, tanpa memandang apakah abnormalitas tersebut terjadi di dalam tubuli seminiferi, dalam epididimis atau oleh perlakuan yang tidak legeartis terhadap ejakulat. Selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dari contoh semen, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi.

Kelainan bentuk sperma diakibatkan oleh shok dingin, panas, sinar X, dan ketidak seimbangan nutrisi dan hormonal/endokrin yang dapat mempengaruhi spermatogenesis. Kualitas semen yang baik memiliki jumlah sperma abnormal 5 -- 15% (Campbell dan Lasley, 1977). Hal ini ditambahkan oleh Masuda (1992) sebanyak (1 -- 20%).

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 19--20 Mei 2016 di Unit Pelayanan Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah: vagina buatan, tabung penampung berskala, labu didih dan penangas, timbangan elektrik, spatula, corong, gelas ukur dan tutupnya, kertas label, kertas *whatman, waterbath erlenmeyer*, tabung reaksi, pipet tetes, *cold top, incubator, container*, gunting, pinset, kertas tisu, *stopwatch*, thermometer, ember, mikroskop, *spektrofotometer, micropipet,* mesin *filling and sealing,* pH meter, *boks* tempat *prefreezing, counter number,* alat hitung, gelas kaca, gelas penutup, kamera, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah: Semen sapi Ongole, Sitrat kuning telur, Na-sitrat, *aquabidestilata*, Telur ayam, Antibiotik *Penicillin* 1000 IU, *Streptomycin* 1 ml, Alkohol 70%, Fruktosa, Rafinosa, Eosin 2% dan Nitrogen cair.

C. Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam kali perlakuan penambahan dosis rafinosa dalam pengencer sitart kuning telur semen Sapi Ongole. Setiap perlakuan dilakukan 4 kali pengulangan. Perlakuaan yang dicobakan adalah konsentrasi rafinosa sebagai berikut:

R1: penambahan rafinosa 0,5% dalam bahan pengencer;

R2: penambahan rafinosa 1 % dalam bahan pengencer;

R3: penambahan rafinosa 1,5% dalam bahan pengencer;

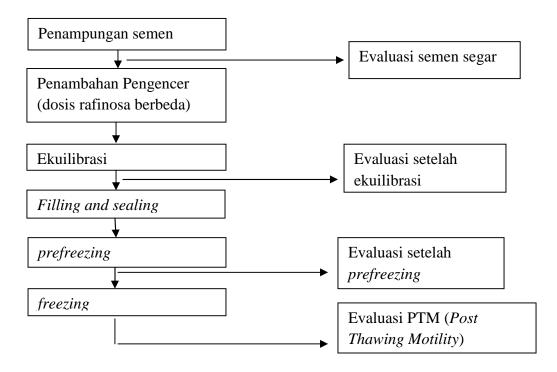
R4: penambahan rafinosa 2% dalam bahan pengencer;

R5 : penambahan rafinosa 2,5% dalam bahan pengencer;

R6: penambahan rafinosa 3% dalam bahan pengencer.

D. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium UPTD-BIBD Lampung yang meliputi proses pembuatan pengencer sitrat kuning telur, pemeriksaan kualitas semen sapi Ongole segar, proses pembuatan semen beku sapi Ongole, dan pemeriksaan kualitas semen beku sapi Ongole berupa persentase motilitas spermatozoa dan persentase hidup spermatozoa.



Gambar 1 . Bagan prosedur pembuatan semen beku

1. Penampungan semen

Proses penampungan semen dimulai dari persiapan tempat penampungan semen, vagina buatan, *bull teaser*, dan pejantan yang akan dikoleksi semennya.

Penampungan semen dilakukan pada pagi hari karena pada pagi hari libido sapi pejantan lebih tinggi dibandingkan dengan siang hari. Pejantan yang akan ditampung semennya harus diberi makan dan dimandikan terlebih dahulu agar semen yang dihasilkan lebih optimal dan tidak terkontaminasi kotoran yang ada ditubuh pejantan. Semen pejantan ditampung apabila penis berwarna merah dan keras kemudian pejantan telah melakukan *false moulting* 2-3 kali dan sudah mengeluarkan cairan aksesori.

2. Evaluasi semen segar

Evaluasi semen segar dilakukan segera setelah semen ditampung dari pejantan.

Evaluasi semen dilakukan untuk mengethaui semen yang ditampung layak untuk dilakukan proses selanjutnya. Evaluasi semen meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi, dan pH sedangkan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, abnormalitas, konsentrasi dan persentase hidup mati spermatozoa.

Semen yang menuhi syarat motilitas 70%, persentase hidup spermatozoa >50% dan persentase abnormalitas spermatozoa tidak lebih dari 20% diencerkan dengan pengencer.

3. Pembuatan pengencer sitrat kuning telur

Pembuatan pengencer sitarat kunign telur dilakukan yaitu pembuatan *buffer* dan pembuatan Pengencer. Komposisi bahan pengencer sitrat kuning telur pada penelitian ini disajikan dalam Tabel 1.

a. Part A (pembuatan buffer)

Pembuatan *buffer* dilakukan dengan cara:

- 1. menimbang 2,9 g Na-sitrat kemudian masukkan kedalam tabung Erlenmeyer;
- 2. menambahkan fruktosa 2,5%;

- mengaduk semua bahan agar homogen kemudian menambahkan aquadest hingga 100 ml dan mengaduk hingga rata selanjutnya dipanaskan hingga suhu 92° C dan dinginkan pada suhu kamar;
- 4. menambahkan antibiotik Penicillin 3 ml dan Streptomycin 1 ml kemudian mengaduk hingga merata;

b. Part B (pembuatan pengencer)

Pembuatan pengencer dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1. menimbang gliserol 6 ml;
- menyiapkan telur segar dan membersihkan kulitnya menggunakan kapas beralkohol 70%;
- 3. memecahkan kulit telur hingga ¹/₃ -- ¹/₂ bagian dengan menggunakan pinset steril. Membuang semua cairan putih telur. Kuning telur yang utuh dan terbungkus selaput vitellin dipindahkan ke atas kertas hisap untuk menghilangkan cairan putih telur yang tersisa;
- 4. memecahkan selaput vitelin dan mengalirkan kuning telur ke dalam gelas ukur tanpa selaput vitelinnya sebanyak 20 ml;
- menuangkan kuning telur dan gliserol yang telah ditimbang ke dalam
 Erlenmeyer kemudian menambahkan larutan *buffer* sebanyak 74 ml dan mengaduk hingga rata.

Tabel 1. Komposisi pengencer sitrat kuning telur

Bahan	Perlakuan					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Na Sitrat (g)	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
Fruktosa (g)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Rafinosa (g)	0,5	1	1,5	2	2,5	3
Penisillin (100.000 IU/100 ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Streptomisin (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Gliserol (ml)	6	6	6	6	6	6
Kuning telur (ml)	20	20	20	20	20	20
Aquabides (ml)	74	74	74	74	74	74

Sumber: Balai Inseminasi Buatan Lembang

Keterangan : R1= dosis rafinosa 0,5%, R2= dosis rafinosa 1%, R3= dosis rafinosa 1,5%, R4=dosis rafinosa 2%, R5= dosis rafinosa 2,5%, R6= dosis rafinosa 3%

4. Pencampuran pengencer sitrat kuning telur dengan rafinosa

Pengencer dibagi menjadi 5 bagian dengan volume sama banyak kemudian menambahkan rafinosa dengan persentase (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5% dan 3%) pada masing-masing pengencer, mengaduk hingga merata.

Volume bahan pengencer dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$jumlah\ pengencer\ (ml) = \frac{\text{volume seme}\ x\ \%\ \text{Motilitas}\ x\ \text{Konsentrasi}}{\text{dosis staw IB}} - \text{volume semen}$$

5. Ekuilibrasi

Ekuilibrasi adalah waktu yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan dapat mencegah kematian spermatozoa yang berlebihan. Ekuilibrasi dilakukan di dalam *cool top*

selama 4 jam. Proses ekuilibrasi dilakukan setelah semen dicampur dengan bahan pengencer.

6. Evaluasi setelah ekuilibrasi

Aminasari (2009) mengatakan bahwa pemeriksaan setelah ekuilibrasi atau biasa disebut dengan uji *before freezing* (BF) adalah pemeriksaan terhadap semen segar yang telah ditambahkan pengencer dan didinginkan pada temperatur 5⁰ C selama 1-- 2 jam. Evaluasi setelah ekuilibrasi meliputi pemeriksaan motilitas individu minimal 55%, pemeriksaan abnormalitas dan pemeriksaan hidup mati spermatozoa.

7. Filling dan sealing

Filling sealing adalah suatu prose pengisian semen yang telah ditambahkan bahan pengencer ke dalam *straw* dengan menggunakan mesin *filling-sealing*. Semen dikemas di dalam mesin *cool top* dengan suhu 5--6^oC secara otomatis dan diisi ke dalam straw yang berisi 0,25 ml semen dengan konsentrasi sperma 25x10⁶sel/dosis (BIB Poncowati, 2012).

8. Proses prefreezing

Proses prefreezing semen dilakukan dengan cara meletakan straw menggunakan boks diatas uap nitrogen selama 10 menit pada kisaran suhu mencapai -140°C. Boks yang digunakan untuk proses *prefreezing* diisi dengan nitrogen cair dengan batas ketinggian 10 cm. Sedangkan, jarak permukaan nitrogen cair dalam boks dengan straw ±6 cm. Proses *prefreezing* dilakukan dalam kondisi tertutup dengan tujuan

untuk mengurangi proses penguapan nitrogen cair di dalam boks. (BIB Poncowati, 2012).

9. Evaluasi setelah prefreezing

Evaluasi setelah *prefreezing* dilakukan untuk mengetahui motilitas individu minimal 45%, persentase spertmatozoa hidup dan abnormalitas spermatozoa.

10. Freezing

Freezing merupakan proses pembekuan semen yang telah dimasukkan didalam straw dan telah melwati proses ekuilibrasi. Proses pembekuan dilakukan di dalam kontainer yang berisi nitrogen cair bersuhu -196°.

11. Evaluasi Post thawing motility

a. Pemeriksaan motilitas spermatozoa setelah pemebekuan

Pemeriksaan motilitas dilakukan dengan cara:

- 1. mengambil semen beku dengan pengencer sitrat kuning telur dengan penambahan rafinosa (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%) kemasan *straw* dari container kemudian *thawing* dengan air yang bersuhu 35 0 C selama 15 detik masing-masing 3 *straw*;
- 2. meneteskan semen dari straw pada gelas obyek kemudian menutup dengan gelas penutup;

- mengamati motilitas spermatozoa dengan mikroskop pada perbesaran sedang (10 x 40);
- menentukan motilitas spermatozoa sesuai dengan kriteria 0--100% (Toelihere, 1993).

b. Pemeriksaan presentase spermatozoa hidup setelah pembekuan

Pemeriksaan persentase spermatozoa hidup dilakukan dnegan cara:

- 1. meneteskan satu tetes eosin 2% pada ujung gelas objek;
- 2. meneteskan semen beku dengan pengencer sitrat kuning telur dengan penambahan rafinosa (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%) dengan ukuran yang sama dengan pewarna pada ujung gelas objek yang sama;
- 3. menenpelkan ujung gelas objek yang lain atau ujung gelas penutup pada kedua cairan sehingga keduanya bercampur, kemudian didorong ke ujung gelas objek,
- 4. mengeringkan preparat ulas dengan cara menggerakkkan di atas nyala lilin atau pemanas Bunsen;
- 5. memeriksa spermatozoa yang hidup dan mati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran sedang (10x40) spermatozoa yang hidup tidak berwarna , sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah atau merah muda.
 Jumlah spermatozoa yang dihitung minimal 210 sel;

6. menghitung presentase spermatozoa hidup dengan rumus:

$$Spermatozoa\ hidup\ (\%) = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\ \%$$

(Kristanto, 2004).

c. Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa setelah pembekuan

Pemeriksaan abnormalitas dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- 1. meneteskan satu tetes eosin 2% pada ujung gelas objek;
- meneteskan semen beku dengan pengencer sitrat kuning telur dengan penambahan rafinosa (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%) pada ujung gelas objek kemudian menutup dengan gelas penutup;
- 3. menenpelkan ujung gelas objek yang lain atau ujung gelas penutup pada kedua cairan sehingga keduanya bercampur, kemudian didorong ke ujung gelas objek;
- 4. mengeringkan preparat ulas dengan cara menggerakkkan di atas nyala lilin atau pemanas Bunsen;
- 5. memeriksa spermatozoa yang abnormal dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran sedang (10x40);
- 6. menentukan abnormalitas spermatozoa sesuai dengan kriteria yang ada;
- 7. pemeriksaan abnormalitas dihitung dengan rumus:

% abnormalitas =
$$\frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah spermatozoa keseluruhan}} \times 100 \%$$

E. Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati adalah:

- 1. motilitas spermatozoa;
- 2. persentase spermatozoa hidup;
- 3. abnormalitas spermatozoa.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1% dilanjutkan dengan uji Polinomial Ortogonal (Steel dan Torrie 1993) untuk peubah yang berpengaruh nyata.

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpukan sebagai berikut:

- Penambahan dosis rafinosa di dalam pengencer sitrat kuning telur tidak
 berbeda nyata (P>0,05) terhadap persentase motilitas ekuilibrasi, persentase
 motilitas *prefreezing*, persentase motilitas PTM, persentase spermatozoa
 hidup *prefreezing*, persentase spermatozoa hidup PTM, persentase
 abnormalitas ekuilibrasi, persentase abnormalitas *prefreezing*, dan persentase
 abnormalitas PTM.
- 2. Penambahan dosis rafinosa di dalam sitrat kuning telur berbeda sangat nyata $(P<0,01) \ terhadap \ persentase sermatozoa hidup ekuilibrasi berpola kuadratik dengan persamaan \acute{Y}=66,49+17,94x-4,23x^2.$
- Penambahan dosis rafinosa yang optimum terhadap persentase spermatozoa hidup yaitu 2,1%

B. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan disarankan untuk menambahkan rafinosa sebanyak 2,1% dalam pengencer sitrat kuning.

DAFTAR PUSTAKA

- Affandhy, L., Dikman dan Aryogi. 2007. Petunjuk Teknis Manajemen Perkawinan Sapi Potong. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Loka Penelitian Sapi Potong. Grati, Pasuruan
- Aminasari, D. P. 2009. Pengaruh Umur Pejantan Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. http://elibrary. Ub. Ac. Id/bitstream/123456789/21674/1/pengaruh-umur-pejantan-terhadap-kualitas-semen-beku-sapi-limousin.pdf. Diakses 3 Juni 2016
- Arifiantini, R. I., T. L. Yusuf dan Yanti. 2005. Kaji bidang semen beku sapi Frisien Holstein menggunakan bahan pengencer dari berbagai Balai Inseminasi Buatan di Indonesia. J. Anim. Prod. 7 (3): 168--176
- Arifiantini, R. I dan T. L. Yusuf, 2006. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi Frisien Holstein. Majalah Ilmiah Peternakan. 9 (3): 89--93
- Arifiantini R. I, Purwantara B. 2010. Motility and viability of Fresian Holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. J Indonesian Trop Anim Agric 35(4): 222--226.
- Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. 2008. Standar Operating Procedure (SOP) Produksi Semen Beku. Singosari. Malang
- Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung Tengah. 2012. Standar Operasional Prosedur. BIBD Lampung Tengah. Lampung Tengah
- Bearden, H. J, and J. W. Fuquay. 2000. Applied Animal Reproduction. 5th ed. Prentice Hall. Upper Saddle River. New Jersey
- Best B. 2011. Viability, Cryoprotectant Toxicity and Chilling Injury in Cryogenics. http://www.benbest.com/pdf. Diakses pada 4 Juni 2016
- Blakely, J. dan D. H. Bade. 1992. Pengantar Ilmu Peternakan. Penerjemah: B. Srigandono. Cet. ke-2. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Brezlaff, K. 1995. Goat Breeding and Infertility.p. 169-207. in. J. Meredith (eds).

 Animal Breeding and Infertility. Blackweel Science Ltd. Victoria, Australia
- Burhan, B., 2003. Panduan Praktis Memilih Produk Daging Sapi. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Butar, E. 2009. Efektifitas Frekuensi Exersice Terhadap Peningkatan Kualitas Semen Sapi Simental. http://repository.usu.ac.id/bitstream/1/09E00898.pdf. Diakses pada 3 Juni 2016
- Campbell, J. R. and J. F. Lasley. 1977. The Science of Animal that Serve Menkind Tata Mc. 3 th Ed. Graw Hill. New Delhi
- Colenbrander B., A. R. Raseli, A. Van Buiben, J. Parlevliet and B.M. Gadella. 1992. Assessment of sperm cell membrane integrity in the Horse. Act Vet Scand Suppl 88: 49--58.
- Evans, G. W. and M. C. Maxwell. 1987. Salamons Artifical Insemination Of Sheep and Goats. Butterworths. London
- Fernández, S. M. R., F. Martínez-Pastor, V. García-Macías, M. C. Esteso, A. J. Soler, P. de Paz, L. Anel and J. J. Garde. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (Cervus elaphus hispanicus) epididymal spermatozoa. Theriogenology 67(4): 738--753
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung
- Garner, D. L dan E. S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In Hafez B and E. S. E. Hafez . Reproduction in Farm Animal. 7th Ed. Philaselphia.
- Hafez, E. S. E. 1987. Reproduction In Farm Animal. 5th Ed. Lea Febringer
- Hafez, E. S. E. 2000. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animals. 7th edition. Lippincott Wiliams and Wilkins. Maryland. USA
- Herdis dan I. Kusuma. 2003. Penggunaan control internal drugs release dan ovalumon dalam sinkronisasi berahi Domba Garut. Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia 5(5): 120--125
- Junianto, L., B. Sutiono dan S. Kismiati. 2000. Pengaruh pengencer semen dengan berbagai kuning telur unggas terhadap motilitas dan daya hidup sperma ayam Kampung. Jurnal Tropical Animal (2) 2:30--34.

- Kristanto. 2004. Peranan Gliserol dan Fetal Bovine Serum dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Krystalia, C. 2013. Metabolisme Fruktosa dan Galaktosa. http://cindy-krystalia.co.id/2013/05/biokimia.htnl. Diakses pada 7 Juni 2016
- Lindsay, D. R., K. W. Entswistle dan A. Winantea. 1982. Reproduksi Ternak di Indonesia. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang
- Mann, T. 1964. The Biochemistry of Semen. Methuen & Co. LTD. London
- Masuda, H. 1992. Reproductive Function of Male Livenstock and Semen Phisiology. In: S. Kudo (Ed.). Artificial Insemination Manual for Cattle. Association of Livestock Technology. Nikkapu
- Morel D. M. C. G. 1999. Equine Artificial Insemination. Wallingford. Cabi Publishing
- Mukminat, A. 2014. Pengaruh Penambahan Berbagai Sumber Karbohidrat pada Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Mulyono, S. 1998. Teknik Pembibitan Kambing dan Domba. Penebar Swadaya
- Naing. S. W., H. Wahid, M. K. Azam, Y. Rosnina, A. B. Zuki, S. Kazhal, M. M. Bukar, M. Thein, T. Kyaw and M. M. San. 2010. Effect of sugars on characteristic of Boer goat semen after cryopreservation. Anim Reprod Sci 122: 23--28. Philadelphia. USA
- Nalbandov A. V. 1990. Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Cetakan Pertama. UI-Press. Jakarta
- Paulenz H., L. So'derqui, T. Adnøy, O. H. Fossen and K. A. Berg. 2003. Effect of milk and trisbased extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. Theriogenology. 60: 759--766
- Pegg D. E. 2002. The history and principles of cryopreservation. Seminar Reprod Med. 20: 5--13
- Puka, V., 1996. Pengaruh Beberapa Bahan Pengencer Terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Brangus. Skripsi Fakultas Peternakan Undana. Kupang
- Rizal, M., M. R. Toelihere, T. L. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2003.

- Kriopreservasi semen domba Garut dalam pengencer tris dengan konsentrasi laktosa yang berbeda. Media Kedokteran Hewan. 19(2): 79--83
- Rizal, M., Herdis, B. Arief, S. A, Achmad dan Yulnawati. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. JITV. 11: 123--130.
- Rizal, M dan Herdis. 2008. Peranan beberapa jenis Gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. JIVT. 11 (2): 123--130
- Salisbury, G. W. dan N. L. Van Denmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi (physiologi and Artifical Insemination of Cattle). Diterjemahkan oleh Djanuar, R. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Salamon, S. And W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. Anim, reprod. Sci 62: 77--111
- Savitri, O. A., T. Y. Laswardi, D. Sajuthi dan R. I. Arifiantini. 2014. Kualitas semen cair kambing peranakan Etawah dalam modifikasi pengencer Tris dengan Trehalosa dan Rafinosa. Jurnal Veteriner 15 (1): 11--22
- Setiono, N. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman dengan Dosis Krioprotektan Gliserol yang Berbeda dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Sinha, S., B. C. Deka, M. K. Tamulu, dan B. N. Borgohain. 1992. Effect of equilibration period and glicerol level in tris extender of quality of frozen goat semen. Indian Vet. J Vol 69: 1107--1110
- Siregar T. N dan Hamdan. 2004. Evaluasi daya tahan hidup spermatozoa kambing Peranakan Ettawah dalam beberapa pengencer sederhana. J Sains Veteriner 22 (2): 1--5
- Siregar, S. B. 2008. Penggemukan Sapi. Penebar Swadaya. Bogor
- Solihati, N., R. Idi, S. R. Darojah, M. Rizal, dan M. Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi Peranakan Ongole (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. Animal Production. 1 (10): 22--29
- 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. J Veteriner 10 (3): 135-142

- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie., 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika (Pendekatan Biometrik) Penerjemah B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Subowo. 1995. Biologi Sel. Angkasa. Bandung
- Sudarmono, A. S. dan Bambang. 2009. Sapi Potong. Penebar Swadaya. Jakarta
- Sugiarti, T., E. Triwlanningsih, P. Situmorang, R. G. Sianturi dan D. A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan katalase dalam produksi semen dingin sapi. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 4-5 Agustus 2004. Puslitbang Peternakan. Bogor. hlm. 215--220
- Supriatna, I dan F. H. Pasaribu. 1992. In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio, dan Pembekuan Embrio. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Toelihere, M. R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung

 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa. Bandung
- Trias, P. A. H. 2001. Kualitas sperma dan pengaruh bahan pengencer terhadap daya hidup spermatozoa domba lokal. Buletin Pertanian dan Peternakan 2(3):14--20
- Viswanath R and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid frozen state. Anim Reprod Sci 62:23--53
- Werdhany. I. W.,M. R. Toelihere, I .Supriatna, dan I. K. Sutama. 2000. Efek pemberian berbagai konsentrasi a-tokoferol sebagai antioksidan dalam pengencer tris sitrat terhadapa motilitas sperma kambing peranakan etawah. Prosiding Seminar Nasioanal Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan. Bogor, 18--19 Oktober 1999. Hlm 244--252
- White, I. G. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. Reprod. Fertil. Dev. 5: 639-658.
- Widiastuti, E. 2001. Kualitas Semen Beku Sapi FH dengan Penambahan Antioksidan Vitamin C dan E. Skripsi. Fakultas Peternakan. Intitut Pertanian Bogor. Bogor
- Yildiz C., A. Kaya, M. Aksoy and T. Tekeli. 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. Theriogenology 54: 579--585
- Yulnawati dan Herdis. 2009. Kualitas sperma cair Domba Garut pada penambahan sukrosa dalam pengencer tris kuning telur. JITV 14 (1): 45--49