

**PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGECER
SUSU SKIM TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE HIDUP DAN
ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE
(Skripsi)**

Oleh :

Indah Iftinandari Munzir



**JURUSAN PETERNAKAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRAK

PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGECER SUSU SKIM TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE HIDUP DAN ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE

Oleh

INDAH IFTINANDARI MUNZIR

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Pelayanan Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah (UPTD-BIBD) Lampung Tengah, pada 23—24 Mei 2016, bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan dosis rafinosa yang berbeda dan dosis rafinosa optimum dalam pengencer susu skim yang dapat mempertahankan persentase motilitas, persentase hidup dan persentase abnormalitas spermatozoa semen beku sapi Ongole. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan yaitu 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3,0% dalam pengencer susu skim dan masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1%, dan untuk peubah yang nyata dilakukan uji polinomial ortogonal pada taraf nyata 5% dan atau 1% untuk mengetahui dosis rafinosa yang optimum. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan dosis rafinosa memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap persentase motilitas setelah ekuilibrisasi dan preefreezing, persentase spermatozoa hidup setelah ekuilibrisasi dan preefreezing, serta persentase abnormalitas spermatozoa setelah preefreezing, dan PTM. Penambahan dosis rafinosa dalam bahan pengencer susu skim berpengaruh sangat nyata ($P<0,01$) terhadap persentase motilitas spermatozoa PTM berpola regresi linier dengan persamaan $=25,08+4x$, persentase spermatozoa hidup PTM berpola regresi linier dengan persamaan $=22,55+5,77x$ dan persentase abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibrisasi berpola regresi linier dengan persamaan $=6,36-1,71x$.

Kata kunci: Sapi Ongole, Kualitas semen, Rafinosa, Susu skim

**PENGARUH PENAMBAHAN DOSIS RAFINOSA DALAM PENGECER
SUSU SKIM TERHADAP MOTILITAS, PERSENTASE HIDUP DAN
ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI ONGOLE**

Oleh

Indah Iftinandari Munzir

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 PENGECER
SUSU SKIM TERHADAP MOTILITAS,
PERSENTASE HIDUP DAN
ABNORMALITAS SPERMATOZOA SAPI
ONGOLE**

Nama Mahasiswa

: **Indah Iftinandari Munzir**

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1214141039

Jurusan

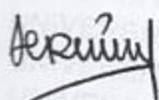
: Peternakan

Fakultas

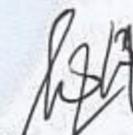
: Pertanian

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

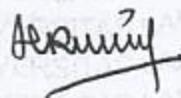


Sri Suharyati, S.Pt., M.P.
NIP 19680728 199402 2 002



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

2. Ketua Jurusan Peternakan

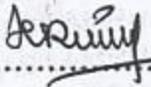


Sri Suharyati, S.Pt., M.P.
NIP 19680728 199402 2 002

MENGESAHKAN

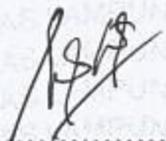
I. Tim Penguji

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



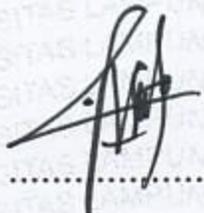
.....

Sekretaris : **drh. Madi Hartono, M.P.**

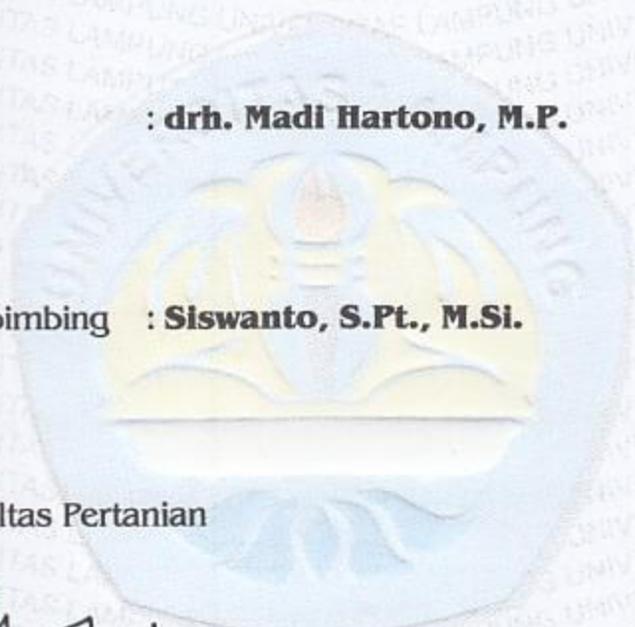


.....

Penguji
Bukan Pembimbing : **Siswanto, S.Pt., M.Si.**



.....



Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M.Si.
NIP 19611020 198603 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **1 September 2016**

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung pada 1 Juni 1994 dan merupakan putri ketiga dari tiga bersaudara, hasil buah cinta dari pasangan Bapak Hi. Munzir Zen, S.H. dan Ibu Hj. Yuliati Rauf, S.Pd.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-kanak Persit pada tahun 2000; Sekolah Dasar Kartika II-5 Bandar Lampung pada tahun 2006; Sekolah Menengah Pertama Negeri 4 Bandar Lampung pada 2009; Sekolah Menengah Atas Negeri 1 Bandar Lampung pada 2012. Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas, Bandar Lampung pada 2012, melalui Seleksi Mandiri.

Pada 2015, penulis melaksanakan Praktik Umum di Balai Inseminasi Buatan Lembang, Kabupaten Lembang, Jawa Barat. Dan pada tahun 2016 melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Pekon Ampai, Kecamatan Margapunduh, Kabupaten Pesawaran, Provinsi Lampung.

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif di kepengurusan Himpunan Mahasiswa Peternakan (HIMAPET) sebagai Anggota Biasa dan Bendahara Umum periode 2013-2014.

Alhamdulillahirabbil'alamin

*Kuucapkan puji syukur atas segala rahmat Allah SWT
atas segala nikmat dan hidayah-Nya serta suri tauladanku
Nabi Muhamad SAW yang selalu aku nantikan di Yaumul
Akhir kelak*

*Dengan segala bentuk syukur, kupersembahkan karya kecil
sebagai tanda pengabdianku kepada*

*Buya dan Umi, sebagai wujud baktiku, cinta, kasih sayang,
dan terima kasih telah sabar membesarkan dan mendidik
serta selalu memberikan semangat dengan ketulusan hati
untuk menjadikan putrimu ini menjadi pribadi yang lebih baik*

*Hadih kasih kepada kakak dan abang serta keluarga besar
dan para sahabat atas segala bentuk dukungan yang
diberikan*

*Serta lembaga yang turut mendidik dan membangun
diriku dalam hal berfikir dan bertindak
Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian,
Universitas Lampung*

Ilmu itu lebih baik dibandingkan harta. Ilmu menjaga engkau dan engkau menjaga harta. Ilmu itu penghukum dan harta itu terhukum. Harta itu kurang jika dibelanjakan tetapi ilmu bertambah bila dibelanjakan.

(Saidina Ali bin Abi Thalib)

*Carilah ilmu sejak dari buaian hingga ke liang lahat
(Al Hadits)*

Allah tidak membebani seseorang itu melainkan sesuai dengan kesanggupan

(QS. Al-Baqarah: 286)

Maka nikmat Tuhan-mu yang manakah yang ksamu dustakan

(QS. Al-Ghaafir: 55)

Ilmu tanpa adab seperti api tanpa kayu, dan adab tanpa ilmu seperti ruh tanpa jasad

(Zakariya Al-Anbani)

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)

The big or small the problem is, depends on how we handle it

Be good and do good..

(Indah Iftinandari Munzir)

Selemah-lemah manusia ialah orang yang tak mau mencari sahabat dan orang yang lebih lemah itu adalah orang yang menyia-nyikan sahabat yang telah di cari

(Ali bin Abi Thalib)

SANWACANA

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

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. 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, Dosen Pembimbing Akademik, dan Dosen Pembimbing Utama-- atas izin, bimbingan, arahan, kesabaran serta nasihat yang telah diberikan selama perkuliahan dan menyelesaikan skripsi;
3. Bapak drh. Madi Hartono, M.P.--selaku Pembimbing Anggota--atas bimbingan, arahan, kesabaran serta nasihat yang dapat membangun diri penulis;
4. Bapak Siswanto, S.Pt., M.Si. --selaku Pembahas--atas bimbingan, kritik, saran dan arahan kepada penulis;
5. Bapak/Ibu Dosen Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung--atas bimbingan, kesabaran, arahan dan nasihat selama menempuh pendidikan;

6. Bapak Eko P Widodo – selaku Kepala Balai Inseminasi Buatan Daerah(BIBD) Terbanggi Besar Lampung – atas izin, arahan, bantuan, dan fasilitas yang telah diberikan selama penelitian;
7. Bapak drh. Anwar, ibu Murtiawan, S.Pt., Bapak Ir. Joko, Bapak Pur, Bapak Sarimin, Mas Yasir, Mas Tri, dan Mas Agung; atas kesabaran, bimbingan dan sarannya selama pelaksanaan penelitian
8. Buya tercinta Munzir Zen, S.H. dan Umi tercinta Yuliati Rauf, S.Pd yang sangat Ina sayangi- atas cinta kasih, kesabaran, doa, motivasi, nasehat, dukungan baik moril maupun materil tak terhingga kepada penulis;
9. Kakak tercinta Ayu Ziliza Hiknarosa, S.H., M.H. dan Abang tercinta Nandaza Parbaraya, S.T.—atas cinta kasih, semangat, dukungan dan nasihat yang selalu diberikan kepada Ina;
10. Zemma dan Zecko yang kakak Ina sayangi – atas cinta kasih, kehadiran, dan selalu menghibur dikala penat;
11. Sevi Edelweis dan Tias Syahputri – atas persahabatan, kasihsayang, perhatian, dan semangat yang selalu diberikan;
12. *Sweetheart* terkasih – Cek Revi, Dinda, Cik Vini, Tati Poet, Batin Ken, Nanda, Essy, Nad Kiting, Feby, Dawny – atas persahabatan, semangat, dukungan yang selalu diberikan;
13. Putra Rama Disa – atas kesabaran, perhatian, semangat, doa, dan dukungan yang selalu diberikan;
14. Tiga Rafinosa – Iis Nurlia dan Sintha Pubiandara – atas pengalaman, pelajaran, perjuangan, kesabaran, kerjasama, semangat, motivasi, perhatian,

dan dukungan yang selalu diberikan selama penelitian hingga skripsi ini selesai;

15. Teman Seperjuangan – Anita Sari, Hindun Larasati, Ertha Colanda, Novia Rachmawati, Dwinta Amalia, dan Para Sahabat 2012 (yang tidak dapat disebutkan satu persatu), dan teman-teman angkatan 13,14, dan 15 -- atas dukungan yang tiada henti, persaudaraan, bantuan, dan kerjasama yang telah diberikan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi;
16. 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.

Semoga semua kebaikan yang telah diberikan kepada penulis menjadi amal kebaikan dan mendapat balasan yang lebih berlipat dari Allah SWT.

Bandar Lampung, Juni 2016

Penulis

Indah Iftinandari Munzir

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang dan Masalah.....	1
B. Tujuan Penelitian.....	4
C. Kegunaan Penelitian.....	4
D. Kerangka Pemikiran.....	4
E. Hipotesis.....	6
II. TINJAUAN PUSTAKA	7
A. Sapi Ongole.....	7
B. Semen.....	8
C. Metabolisme Spermatozoa.....	9
D. Pengencer Semen.....	10
E. Susu Skim.....	12
F. Rafinosa.....	14
G. Kualitas Semen.....	17

H. Motilitas Spermatozoa.....	18
I. Persentase Hidup Spermatozoa.....	19
J. Abnormalitas Spermatozoa.....	20
III. BAHAN DAN METODE	22
A. Tempat dan Waktu Penelitian.....	22
B. Alat Dan Bahan Penelitian.....	22
C. Metode Penelitian.....	23
D. Prosedur Penelitian.....	23
1. Penampungan semen.....	24
2. Pengenceran semen.....	26
3. Ekuilibrasi.....	29
4. <i>Filling</i> dan <i>sealing</i>	29
5. Proses <i>prefreezing</i>	30
6. Proses <i>freezing</i>	30
7. <i>Test after thawing</i>	30
E. Peubah yang Diamati.....	31
1. Motilitas spermatozoa.....	31
2. Persentase hidup spermatozoa.....	31
3. Abnormalitas spermatozoa.....	32
F. Analisis Data.....	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
A. Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi Ongole.....	33
B. Pengaruh Penambahan Dosis Rafinosa Terhadap	

Kualitas Spermatozoa.....	35
1. Penilaian motilitas spermatozoa selama pembekuan.....	35
2. Penilaian persentase spermatozoa hidup selama pembekuan..	40
3. Penilaian persentase abnormalitas spermatozoa selama Pembekuan.....	45
V. SIMPULAN DAN SARAN	51
A. Simpulan.....	51
B. Saran.....	51

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi pengencer susu skim.....	27
2. Kualitas semen segar Sapi Ongole.....	33
3. Hasil rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Ongole.....	36
4. Hasil rata-rata persentase spermatozoa hidup sapi Ongole.....	41
5. Hasil rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa sapi Ongole.....	46
6. Motilitas spermatozoa setelah ekuilibrase.....	57
7. Motilitas spermatozoa setelah <i>prefreezing</i>	57
8. Motilitas spermatozoa PTM.....	57
9. Spermatozoa hidup setelah ekuilibrase.....	57
10. Spermatozoa hidup setelah <i>prefreezing</i>	58
11. Spermatozoa hidup PTM.....	58
12. Abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibrase.....	58
13. Abnormalitas spermatozoa setelah <i>prefreezing</i>	58
14. Abnormalitas spermatozoa PTM.....	59
15. Hasil analisis ragam motilitas setelah ekuilibrase.....	59
16. Hasil analisis ragam motilitas setelah <i>Prefreezing</i>	59
17. Hasil analisis ragam motilitas PTM.....	59
18. Hasil analisis ragam spermatozoa hidup setelah ekuilibrase.....	59

19. Hasil analisis ragam spermatozoa hidup setelah <i>Prefreezing</i>	60
20. Hasil analisis ragam spermatozoa hidup PTM.....	60
21. Hasil analisis ragam abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibras.....	60
22. Hasil analisis ragam abnormalitas spermatozoa setelah <i>prefreezing</i>	60
23. Hasil analisis ragam abnormalitas spermatozoa PTM.....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sel Spermatozoa.....	9
2. Prosedur kerja penelitian.....	24
3. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase motilitas spermatozoa <i>post thawing motility</i>	39
4. Spermatozoa hidup dan spermatozoa mati.....	41
5. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase spermatozoa hidup <i>post thawing motility</i>	43
6. Hubungan antara dosis rafinosa dengan persentase abnormalitas Spermatozoa setelah ekuilibrase.....	47
7. Pembuatan <i>buffer</i> skim.....	61
8. Penambahan kuning telur.....	61
9. Penampungan semen sapi Ongole.....	62
10. Penambahan rafinosa.....	62

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang dan Masalah

Jumlah penduduk di Indonesia yang semakin bertambah membuat kebutuhan bahan pangan semakin meningkat. Salah satu kebutuhan pangan berasal dari protein hewani. Kesadaran masyarakat tentang pentingnya protein hewani berdampak pada tingginya permintaan terhadap sumber protein. Pemenuhan kebutuhan protein hewani dapat dilakukan dengan meningkatkan populasi ternak daging. Salah satu ternak yang berpotensi menghasilkan daging adalah sapi Ongole.

Sapi Ongole merupakan sapi dari golongan *Bos sondaicus* yang berhasil dijinakkan di India. Secara umum sapi Ongole termasuk ternak yang jinak dengan temperamen tenang dengan mata besar, tanduk pendek dan hampir tidak terlihat. Sapi ongole mampu bertahan terhadap panas serta endoparasit dan ektoparasit, mampu beradaptasi terhadap pakan yang jelek, 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 (Burhan, 2003).

Peningkatan populasi sapi Ongole dapat dilakukan dengan menerapkan berbagai teknologi di bidang peternakan yang telah berkembang dengan pesat. Salah satu teknologi yang dapat digunakan untuk meningkatkan populasi sapi Ongole adalah teknik Inseminasi Buatan (IB). Teknik IB merupakan proses memasukkan sperma ke dalam saluran reproduksi betina dengan tujuan membuat betina bunting tanpa perlu terjadi perkawinan secara alami. Tujuan IB adalah sebagai salah satu alat yang diciptakan manusia untuk meningkatkan populasi dan produksi ternak secara kuantitatif dan kualitatif (Toelihere, 1993).

Keberhasilan IB dipengaruhi oleh kualitas semen. Semen yang baik serta layak untuk inseminasi dapat dipertahankan dengan cara pengawetan semen yaitu dengan melakukan pengenceran semen. Pengenceran semen dilakukan untuk menambah volume semen dan menyediakan sumber energi dan zat-zat lain untuk mempertahankan daya tahan hidup dan fertilitas spermatozoa. Mumu (2009) mengemukakan bahwa pengenceran semen bertujuan untuk menambah volume semen dari tiap ejakulasi dan memberi zat-zat makanan yang dibutuhkan untuk mempertahankan daya tahan hidup dan fertilitas, selain itu pengenceran juga dapat memberi perlindungan terhadap sperma dari terjadinya kejutan dingin (*cold shock*), mencegah tumbuhnya kuman dan juga sebagai penyanggah dalam menjaga kestabilan pH.

Bahan pengencer yang dapat digunakan untuk pengenceran semen salah satunya adalah susu skim. Susu skim mengandung zat nutrisi yang dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi. Selain itu, susu skim juga mengandung zat lipoprotein dan lesitin sehingga bisa digunakan dalam pengencer semen untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) dan air susu

juga mengandung enzim yang hancur pada waktu pemanasan. Pemanasan air susu di atas 80°C akan melepaskan gugusan sulfhydryl (-SH) yang berfungsi sebagai zat reduktif yang mengatur metabolisme oksidatif sperma.

Penambahan susu skim pada pengenceran semen belum mencukupi untuk mempertahankan kualitas semen. Hal tersebut dapat diatasi dengan penambahan senyawa lain dalam pengencer, salah satunya adalah karbohidrat. Menurut Salisbury dan Van Denmark (1985), penambahan berbagai bahan lain di dalam pengencer penyanggah kuning telur seperti karbohidrat merupakan salah satu hal yang sangat berarti bagi penyediaan energi untuk spermatozoa. Beberapa jenis karbohidrat yang dapat digunakan dalam pengencer adalah glukosa, fruktosa, laktosa, dan rafinosa.

Rafinosa merupakan suatu trisakarida yang penting, terdiri dari galaktosa, glukosa, dan fruktosa. Penambahan rafinosa di dalam pengencer dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama. Penambahan dosis rafinosa dalam pengencer susu skim sampai saat ini belum dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap penambahan dosis rafinosa pada pengencer susu skim pada semen beku sapi Ongole.

B. Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah

1. mengetahui pengaruh penambahan dosis rafinosa pada pengencer susu skim terhadap motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa pada sapi Ongole;
2. mengetahui dosis optimum penambahan rafinosa dalam pengencer susu skim terhadap motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa pada sapi Ongole.

C. Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada Balai Inseminasi Buatan (BIB) tentang penambahan dosis rafinosa pada pengencer susu skim yang terbaik yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi spermatozoa sapi Ongole.

D. Kerangka Pemikiran

Keberhasilan teknologi Inseminasi Buatan (IB) dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor baik faktor betina, semen, dan inseminator. Sapi betina yang bunting merupakan suatu tanda dari keberhasilan dilakukannya IB dan hal tersebut dapat meningkatkan populasi ternak.

Semen yang akan digunakan dan disimpan dalam waktu yang lama harus ditambahkan bahan pengencer dan kemudian dibekukan untuk menjadi semen beku yang dapat digunakan untuk melakukan IB. Menurut Toelihere (1993), kualitas semen beku dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya adalah suhu dan

cahaya pada saat perlakuan dan penyimpanan semen untuk inseminasi buatan, serta kadar pengenceran dan bahan pengencer yang digunakan. Pengencer yang baik harus dapat mempertahankan fertilitas semen dan dapat menyediakan energi yang cukup untuk mempertahankan hidup sperma dari *cold shock* pada saat pembekuan sampai sperma tersebut siap digunakan untuk IB.

Pengencer susu skim mengandung zat nutrisi yang dapat digunakan spermatozoa sebagai sumber energi. Menurut Toelihere (1993), pengencer susu mempunyai beberapa keunggulan, di antaranya susu mengandung substansi pelindung lesitin yang berfungsi melindungi spermatozoa terhadap cekaman dingin selama proses pembekuan. Berdasarkan hal tersebut penambahan susu skim dilakukan pada pengenceran semen guna melindungi spermatozoa dari *cold shock* pada proses pembekuan.

Penambahan jenis karbohidrat perlu dilakukan sebagai sumber energi dalam pengenceran untuk mempertahankan kualitas semen beku. Menurut Salisbury dan Van Denmark (1985) penambahan karbohidrat ke dalam pengenceran akan sangat berguna dan membantu daya hidup spermatozoa. Salah satu jenis karbohidrat adalah rafinosa yang merupakan suatu trisakarida yang terdiri dari tiga molekul monosakarida yang berkaitan, yaitu galaktosa, glukosa dan fruktosa.

Rafinosa yang ditambahkan pada pengencer semen dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak. Penggunaan dosis rafinosa yang berguna sebagai cadangan sumber energi dalam pengencer susu skim berdampak pada kualitas semen beku yang dihasilkan terutama terhadap motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa. Menurut Savitri *et al.*, (2014),

penambahan trehalosa dan rafinosa pada semen cair kambing peranakan etawa dapat menyimpan cadangan energi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat digunakan oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama.

Rizal *et al.*, (2006) menyatakan bahwa penambahan dextrosa, rafinosa, trehalosa, dan sukrosa 0,4% di dalam pengencer tris mampu meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. Oleh karena itu, perlu dilakukannya penelitian terhadap penambahan rafinosa pada pengencer semen sapi Ongole.

E. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. penambahan dosis rafinosa pada pengencer susu skim berpengaruh terhadap motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa Sapi Ongole;
2. terdapat dosis optimum penambahan rafinosa pada pengencer susu skim yang dapat mempertahankan motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa Sapi Ongole.

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Sapi Ongole

Menurut Murtidjo (1990), sapi Ongole merupakan sapi keturunan *Bos indicus* yang berhasil dijinakkan di India. Sapi Ongole masuk di Indonesia mulai abad ke 19, dan dikembangkan cukup baik di Pulau Sumba sehingga lebih populer dikenal sebagai sapi Sumba Ongole. Persilangan sapi Ongole jantan murni dengan sapi betina Jawa menghasilkan keturunan yang disebut Sapi Peranakan Ongole (PO).

Menurut Siregar (2008), sapi Ongole memiliki karakteristik :

1. punuk yang besar dan kulit longgar dengan banyak lipatan di bawah leher dan perut, telinga panjang serta menggantung;
2. temperamen tenang dengan mata besar, tanduk pendek dan hampir tak terlihat;
3. tanduk sapi betina Ongole lebih panjang daripada tanduk pejantannya;
4. warna bulu putih kusam agak kehitam-hitaman dan warna kulit kuning.

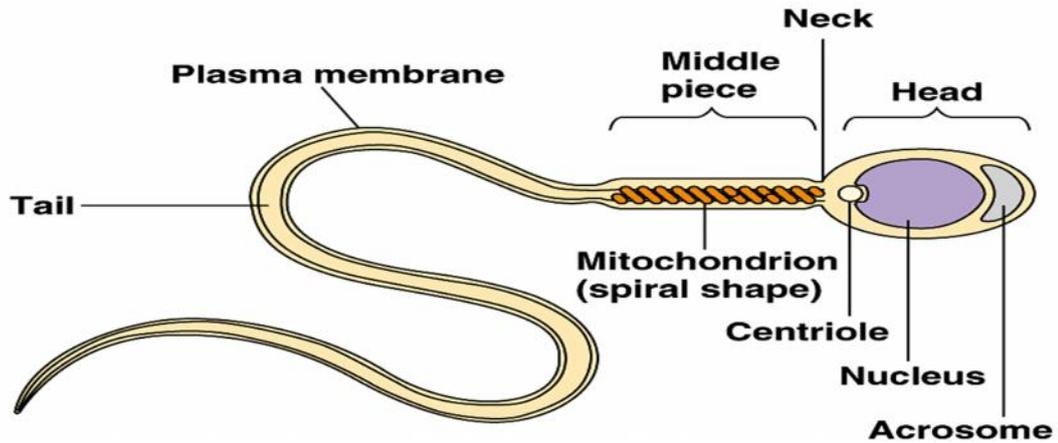
Sapi Ongole memiliki ciri-ciri berwarna putih dengan warna hitam di beberapa bagian tubuh, bergelambir dan berpunuk, dan daya adaptasinya baik. Jenis sapi ini telah disilangkan dengan sapi Madura, keturunannya disebut Peranakan

Ongole (PO) cirinya sama dengan sapi Ongole tetapi kemampuan produksinya lebih rendah (Sugeng, 2003).

B. Semen

Semen adalah sekresi kelamin jantan yang diejakulasikan ke dalam saluran kelamin betina sewaktu kopulasi. Semen terdiri dari spermatozoa yang berada dalam cairan yang disebut plasma semen (Salisbury dan Van Denmark, 1985). Semen merupakan cairan yang terdiri dari hasil sekresi kelenjar kelamin aksesoris dan spermatozoa yang sudah masak dari epididimis seekor sapi pejantan dewasa (Srigandono, 1996). Semen terdiri atas campuran spermatozoa yang dihasilkan oleh jaringan testis di dalam tubulus seminiferus dan plasma semen yang berasal dari kelenjar kelamin pelengkap (Hafez, 1993).

Spermatozoa normal memiliki bagian-bagian yang terdiri atas kepala, leher, badan, dan ekor. Sekitar 2/3 bagian dari dinding depan kepala spermatozoa tampak tertutup oleh akrosom. Tempat sambungan dasar akrosom dan kepala disebut cincin nukleus. Di antara kepala dan badan terdapat sambungan pendek yaitu leher yang berisi sentriol proksimal, terkadang dinyatakan sebagai pusat kinetik aktifitas spermatozoa. Bagian badan dimulai dari leher dan berlanjut ke cincin sentriol. Bagian badan dan ekor mampu bergerak bebas meskipun tanpa kepala. Ekor yang menyerupai cambuk membantu mendorong spermatozoa untuk bergerak maju (Salisbury dan Van Denmark, 1985).



Gambar 1. Sel spermatozoa

Plasma semen atau seminal plasma merupakan sekresi dari epididimis, *vas deferens*, kelenjar prostat, dan vesika seminalis, serta kelenjar *cowper*, cairan ini sangat berpengaruh terhadap sifat fisik dan kimia semen. Di dalam plasma semen terdapat berbagai macam zat organik, zat inorganik, dan air. Zat organik tersebut seperti *phosphorylcholine*, *glycerylphosphorylcholine*, asam sitrat, fruktos, inositol, sorbitol, *ergothionine*, dan *spremine*. Zat inorganik meliputi kalium, kalsium, dan bikarbonat yang relatif tinggi kadarnya dibandingkan dengan yang terdapat dalam tubuh (Partodihardjo, 1992). Plasma semen berguna sebagai *buffer* dan medium bagi spermatozoa agar dapat bertahan lama setelah ejakulasi (Toelihere, 1993).

C. Metabolisme Spermatozoa

Menurut Toelihere (1993), 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. Reaksinya sebagai berikut :



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.

D. Pengencer Semen

Sebelum semen dibekukan, terlebih dahulu dilakukan penambahan pengencer dengan tujuan untuk memperbanyak volume semen dan menunjang daya hidup spermatozoa. Pengencer harus mengandung sumber energi untuk

kelangsungan hidup spermatozoa, unsur penyanggah bertekanan osmosa isotonik, tidak meracuni spermatozoa, dapat melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk pembekuan dan mengandung antibiotik untuk melindungi semen dari kontaminasi (Toelihere, 1993).

Pengencer adalah suatu bahan yang dapat mengawetkan spermatozoa dan menyediakan kondisi osmotik yang baik (menguntungkan) sebagaimana menyediakan energi bagi spermatozoa selama penyimpanan, pendinginan, ekuilibrasi dan pembekuan. Penambahan protektan pendingin seperti kuning telur dan krioprotektan seperti gliserol, karbohidrat, laktosa atau sukrosa adalah penting untuk melindungi spermatozoa selama pendinginan, pembekuan dan *thawing* (Farstad, 1996).

Menurut Toelihere (1993), pengenceran semen bertujuan untuk menambah volume semen dari setiap ejakulasi dan memberi zat-zat makanan yang diperlukan untuk mempertahankan daya tahan hidup dan fertilitas spermatozoa, disamping itu pengencer harus mempunyai sifat-sifat seperti plasma semen yaitu harus dapat menciptakan keadaan yang memungkinkan spermatozoa tahan terhadap kondisi buatan yang berhubungan dengan penyimpanan.

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 Toelihere (1993), pengencer memiliki fungsi sebagai berikut

1. menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi untuk kelangsungan

hidup spermatozoa yang terdiri dari karbohidrat, glukosa, protein, zat anorganik dan inorganik;

2. melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk pendinginan (*cold shock*);
3. menyediakan suatu penyangga untuk mencegah perubahan pH;
4. mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit;
5. mengandung antibiotik untuk melindungi semen dari kontaminasi mikroba;
6. memperbanyak volume semen sehingga lebih banyak hewan betina yang diinseminasikan dalam satu ejakulat.

Bahan pengencer yang digunakan sebagai preservasi semen harus memenuhi persyaratan, sebagai berikut :

1. murah, sederhana dan praktis dibuat tetapi mempunyai daya preservasi tinggi;
2. mempunyai sifat fisik dan sifat kimiawi yang hampir sama dengan semen dan tidak mengandung zat-zat toksik;
3. dapat mempertahankan dan tidak membatasi daya fertilisasi spermatozoa;
4. memberikan kemungkinan penilaian spermatozoa sesudah pengenceran (Toelihere, 1993).

E. Susu Skim

Air susu baik susu segar (susu mentah) maupun susu hasil olahan (susu skim) sebagai bahan pengencer semen berbagai ternak telah lama dimanfaatkan dan memberikan hasil yang baik di beberapa BIB di dalam dan di luar negeri. Susu dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengencer semen karena di dalamnya

terkandung berbagai jenis senyawa kimia yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menunjang kehidupannya terutama dalam proses pengolahan, baik dalam bentuk semen cair-dingin (disimpan pada suhu sekitar 3—5°C) maupun dalam keadaan beku (disimpan di dalam kontainer nitrogen cair dengan suhu sekitar -196°C).

Jones dan Mann (1977) menunjukkan bahwa kuning telur dan susu melindungi spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Diduga kuning telur dan susu membentuk lapisan pelindung terhadap sel spermatozoa, mencegah peroksidasi lipid dari interaksinya dengan sel spermatozoa atau berkombinasi langsung dengan peroksidasi dan kemudian menetralkan pengaruhnya.

Pengencer susu mempunyai beberapa keunggulan, di antaranya susu mengandung substansi pelindung lesitin yang berfungsi melindungi spermatozoa terhadap cekaman dingin selama proses pembekuan (Toelihere, 1993).

Pengencer susu skim bebas lemak dikombinasi dengan glukosa umum digunakan sebagai pengencer terutama untuk penyimpanan tetapi juga baik untuk evaluasi. Pengencer ini dapat menjaga motilitas dan fertilitas spermatozoa dengan baik dan relatif lebih murni serta mudah untuk menyiapkannya. Pengencer ini membutuhkan pemanasan pada suhu 92°C—95°C selama 10 menit untuk menginaktifkan laktenin, yaitu suatu agen anti *streptococcus* yang ditemukan di dalam susu dan dapat bersifat toksik bagi spermatozoa sapi dan kuda (Maxwell dan Salamon, 1993).

Menurut Rizal *et al.*, (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.

F. Rafinosa

Karbohidrat dapat berfungsi ganda. Karbohidrat sederhana seperti glukosa dan fruktosa dibutuhkan sebagai sumber energi, sedangkan karbohidrat molekul besar dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Penggunaan disakarida (trehalosa), trisakarida (rafinosa), dan oligosakarida lainnya pada pengenceran semen beberapa ternak diduga lebih mampu melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan (Yildiz *et al.*, 2000). Trehalosa dan rafinosa adalah karbohidrat dengan molekul besar yang berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler (Rudolph dan Crowne, 1985).

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 (McGilvery dan Goldstein, 1996).

Menurut Rizal *et al.*, (2006), 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.

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. Walaupun 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).

Krystalia (2013) menyatakan bahwa rafinosa adalah suatu trisakarida yang penting, terdiri atas tiga molekul monosakarida yang berikatan, yaitu fruktosa-glukosa-galaktosa. Setelah dihidrolisis sempurna, gugus gula yang pertama

digunakan oleh spermatozoa adalah fruktosa. Fruktosa dalam sel difosforilasi oleh heksokinase atau fruktokinase yang akhirnya menjadi fruktosa 1 fosfat, selanjutnya 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. Ketika sorbitol dehidrogenasenya rendah sorbitol akan menumpuk didalam sel. Ini menyebabkan efek osmotik meningkat, sorbitol menarik air sehingga terjadi pembengkakan dan menyebabkan kematian spermatozoa.

Metabolisme glukosa di dalam 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 glikolisis 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

Untuk keberhasilan perkawinan atau IB, semen harus diproduksi dalam jumlah dan kualitas yang tinggi. Pemeriksaan dan evaluasi meliputi keadaan umum contoh semen, volume, konsentrasi dan motilitas atau daya geraknya. Observasi ini perlu untuk penentuan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan (Toelihere, 1993).

Salisbury dan Van Denmark (1985) menyatakan bahwa kriteria mengenai penilaian semen bertujuan untuk mendapatkan suatu cara pendugaan tidak langsung mengenai potensi semen untuk memperlihatkan fungsi fertilisasinya.

Pemeriksaan dan evaluasi semen penting dilakukan untuk menentukan kualitas semen dan daya reproduksi pejantan, khususnya untuk menentukan

kadar pengencer, karakteristik semen dapat digunakan sebagai indikator dari fertilitas (Toelihere, 1993). Berdasarkan gerakan individual, dilakukan penilaian sebagai berikut : 0. Spermatozoa immotil atau tidak bergerak, 1. Gerak berputar ditempat, 2. Gerak berayun atau melingkar, kurang dari 50 bergerak progresif atau tidak ada gelombang, 3. Antara 50 sampai 80% spermatozoa bergerak progresif dan menghasilkan gerakan massa, 4. Pergerakan progresif gesit dan segera membentuk gelombang dengan 90% sel spermatozoa motil, 5. Gerakan sangat progresif, gelombang sangat cepat bergerak, 100% motil aktif (Toelihere, 1993).

Spermatozoa umumnya mempunyai kecenderungan untuk bergerak bersama-sama ke satu arah, sehingga membentuk suatu gelombang-gelombang yang tebal atau tipis, bergerak cepat atau lambat (Ihsan, 1992). Rendahnya motilitas massa semen ini kemungkinan disebabkan oleh kondisi sapi yang kurang optimal serta rendahnya daya adaptasi sapi tersebut terhadap iklim dan cuaca di Indonesia. Sarastina *et al.*, (2006) menyatakan bahwa sapi lokal akan memiliki daya adaptasi lebih baik dibandingkan dengan bangsa sapi impor.

H. Motilitas Spermatozoa

Ciri utama spermatozoa adalah motilitas atau daya geraknya yang dijadikan patokan atau cara yang paling sederhana dalam penilaian semen untuk inseminasi buatan (Toelihere, 1993). Salisbury dan Van Denmark (1985) menyatakan bahwa ada tiga motilitas spermatozoa : (a) Gerakan progresif. (b) Gerakan berputar. (c) Gerakan ditempat. Dua tipe gerakan terakhir disebabkan oleh gerak ayun-ayun ekor yang abnormal dan ditambahkan

bahwa motilitas kurang dari 50% akan menghasilkan angka konsepsi yang lebih rendah.

Toelihere (1993) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa sapi di bawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering di hubungkan dengan infertilitas. Kebanyakan pejantan fertil mempunyai 50—80% spermatozoa motil, aktif progresif. Hafez (1987) menyatakan bahwa peniliain spermatozoa yang aktif yang bergerak atau hidup dan penilaian dilakukan pada suhu 37°C sampai 40°C.

Persentase sperma yang aktif tidak harus lebih besar dari pada 70%. Sama dengan yang diungkapkan oleh Toelihere (1993) bahwa untuk memperoleh hasil yang lebih tepat sebaiknya semen diperiksa pada suhu 37°C sampai 40°C dengan menempatkan gelas objek di atas suatu meja panas atau menggunakan mikroskop yang dipanaskan secara elektrik.

I. Persentase Hidup Spermatozoa

Persentase hidup atau spermatozoa dapat ditentukan dengan pewarnaan *eosin* atau *eosin-negrosin*. Zat warna *eosin* akan mewarnai spermatozoa yang mati menjadi merah atau merah muda, sedangkan zat warna *negrosin* memberi latar biru hitam (Toelihere, 1993). Salisbury dan Van Denmark (1985) menyatakan bahwa spermatozoa yang hidup dapat di bedakan reaksinya terhadap zat warna tertentu, spermatozoa yang di anggap mati menyerap zat warna dan spermatozoa yang hidup tidak menyerap zat warna. Toelihere

(1993) menyatakan standar minimum bagi kualitas semen yang dapat dipakai untuk inseminasi buatan adalah minimal 50% spermatozoa hidup.

J. Abnormalitas Spermatozoa

Menurut Chenoweth (2005), abnormalitas spermatozoa terbagi dalam dua katagori, yakni berdasarkan sekuen proses pembentukan spermatozoa (primer dan sekunder) dan berdasarkan dampaknya bagi fertilitas. Katagori kerusakan spermatozoa bersifat primer adalah yang terjadi pada saat spermatogenesis, sedangkan sekunder jika kejadiannya setelah spermiasis. Pengelompokkan kelainan mayor dan minor didasarkan pada dampaknya terhadap fertilitas jantan tersebut. Kelainan mayor akan berdampak besar pada fertilitas, sebaliknya kelainan yang bersifat minor dampaknya kecil pada fertilitas.

Bearden dan Fuquay (1980) mengklasifikasikan abnormalitas spermatozoa dalam abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Selanjutnya juga dinyatakan bahwa bentuk-bentuk abnormalitas primer spermatozoa tedapat di dalam testes karena kesalahan spermiogenesis, faktor keturunan, penyakit, defisiensi makanan dan pengaruh lingkungan yang jelek.

Toelihere (1993) menyatakan bahwa abnormalitas primer meliputi kepala kecil, kepala besar, kepala miring, kepala kembar, ekor bercabang, leher besar dan melipat. Sedangkan abnormalitas sekunder meliputi ekor terputus, kepala tanpa ekor, bahagian tengah melipat, adanya butiran-butiran protoplasma proksimal atau distal dan akrosomal terlepas. 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.

III. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada 23-24 Mei 2016 di Laboratoium Unit Pelayanan Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah (UPTD-BIBD) Lampung, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan, tabung penampung berskala dengan ketelitian 0,1 ml, labu didih dan penangas, timbangan elektrik merek Cook master electronic kitchen scale No: GP KS043 dengan ketelitian 0,01 g, termometer, spatula, corong, gelas ukur dan tutupnya, kertas label, kertas *whatman*, *waterbath*, *object* dan *cover glass*, spektrofotometer minitube, *micropipet* dengan ketelitian 0,1 ml, *beaker glass*, tabung erlenmeyer, *cooltop*, mesin *filling and sealing*, pH meter, boks untuk *prefreezing* dan *freezing*, mikroskop, tisu, *counter number*, *stopwatch*, dan kontainer, serta alat tulis.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen yang dikoleksi dari satu pejantan sapi Ongole, susu skim, *aquabidestilata*, *penicilin* 1000 IU dan *streptomycin* 0,1 g, gliserol, fruktosa 1 g, kuning telur 5 ml, rafinosa (0,5%;

1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% dan 3,0%), nitrogen cair, NaCl Fisiologis, NaCl 3%, pewarna *eosin* 2% dan air hangat untuk proses *thawing*.

C. Metode Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam perlakuan dan empat ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah :

R1 : penambahan rafinosa 0,5% dalam bahan pengencer

R2 : penambahan rafinosa 1,0% dalam bahan pengencer

R3 : penambahan rafinosa 1,5% dalam bahan pengencer

R4 : penambahan rafinosa 2,0% dalam bahan pengencer

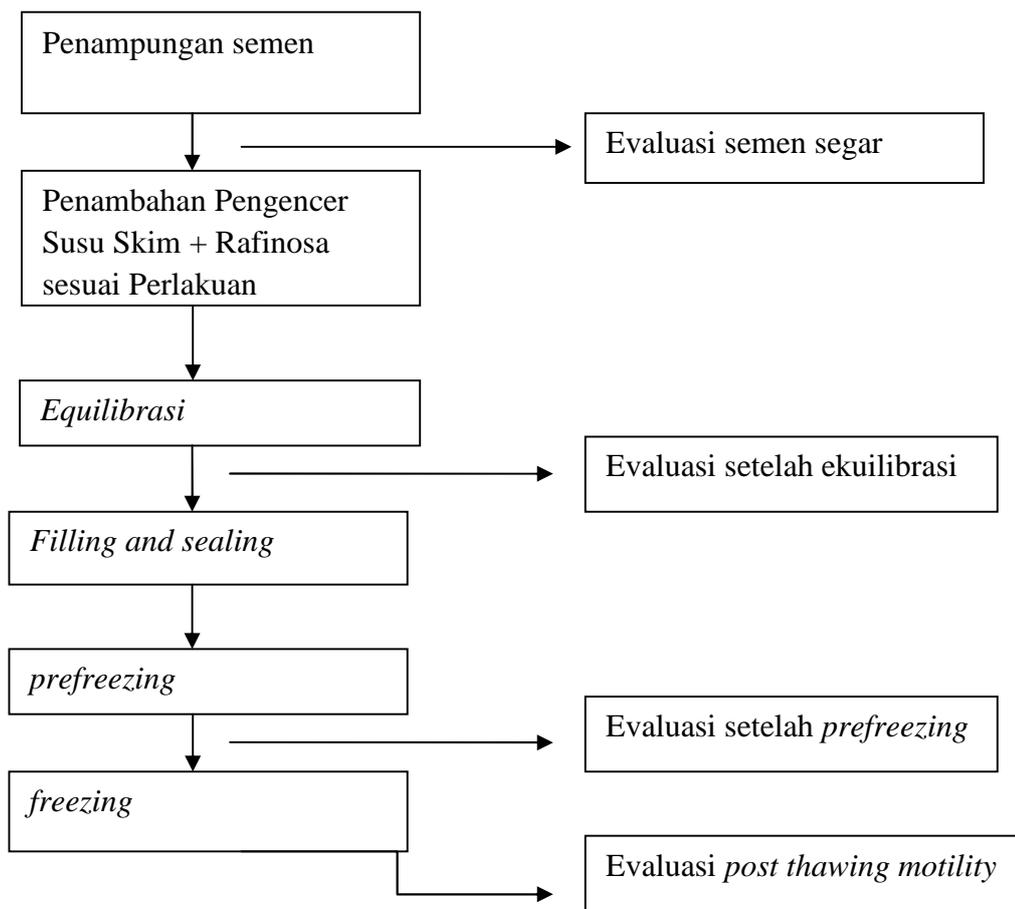
R5 : penambahan rafinosa 2,5% dalam bahan pengencer.

R6 : penambahan rafinosa 3,0% dalam bahan pengencer.

Data yang diperoleh akan dianalisis ragam pada taraf nyata 5% dan atau 1% dan apabila terdapat pengaruh yang nyata akan dilanjutkan dengan uji Polinomial Ortogonal (Steel dan Torrie 1993).

D. Prosedur Penelitian

Tahapan yang dilakukan pada penelitian ini dimulai melalui proses penampungan semen, evaluasi semen segar, penambahan pengencer susu skim serta penambahan dosis rafinosa sesuai dengan perlakuan (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; dan 3,0%), *equilibrasi*, evaluasi setelah *equilibrasi*, *filling dan sealing*, *prefreezing*, evaluasi setelah *prefreezing*, *freezing*, evaluasi *post after thawing*, dan penyimpanan semen beku.



Gambar 2. Prosedur kerja penelitian

1. Penampungan semen

Proses penampungan semen segar diawali dengan menyiapkan sapi yang akan menjadi donor dan *teaser* dalam keadaan bersih dan sehat. *Teaser* yang akan digunakan harus diikat pada kandang jepit di tempat penampungan agar *teaser* tidak lari dan tidak memberontak saat proses penampungan semen secara perlahan agar *teaser* tidak *stress*.

Sapi pejantan yang menjadi donor harus dilakukan *false mount/teasing* sebanyak 2—3 kali sebelum semen ditampung. Setelah *teasing* dilakukan semen dapat

segera ditampung menggunakan *artificial vagina* (AV) pada saat terjadi ejakulasi, penis harus masuk tepat pada AV dan semen jangan sampai tercecer di luar AV. Menurut Toelihere (1993), perubahan suhu dan pengaruh cahaya matahari dapat mempengaruhi pergerakan dari spermatozoa, sehingga semen tersebut secepatnya dibawa ke laboratorium pembuatan semen beku BIBD Lampung untuk diproses lebih lanjut.

Semen segar yang akan diproses menjadi semen beku harus melalui *quality control* pertama yang terdiri dari berbagai tahapan, diantaranya uji kualitatif semen segar berupa uji secara makroskopis (volume, warna, konsistensi semen segar dan pH semen) dan mikroskopis (motilitas massa, motilitas individu dan konsentrasi sperma).

Evaluasi semen segar dengan melakukan uji mikroskopis memiliki kisaran persentase. Kebanyakan pejantan fertile mempunyai 50—80% spermatozoa motil, aktif progresif. Toelihere (1993) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa sapi di bawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan sering di hubungkan dengan infertilitas.

Penilaian konsentrasi sangat penting karena faktor inilah yang menggambarkan sifat-sifat semen dan dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas semen (Toelihere, 1993). Jumlah sel spermatozoa setiap unit volume semen sapi bervariasi dari nol sampai tiga miliar (3.000×10^6) sel spermatozoa setiap ml. Konsentrasi spermatozoa yang berderajat tinggi biasanya berkisar dari 2.000×10^6 sampai 2.200×10^6 sel spermatozoa (Salisbury dan Van Denmark, 1985).

2. Pengenceran semen

Proses pembuatan pengencer susu skim

a. Pembuatan *buffer* skim

Pembuatan *buffer* skim dilakukan satu hari sebelum penampungan semen.

Tahapan proses pembuatan *buffer* skim yaitu

- a. menyiapkan alat (kompor pemanas, labu didih, *beaker glass*, corong, kertas saring, gelas ukur 100 ml, spatula, termometer, timbangan analitik, *tissue*) dan bahan (skim bubuk, aqua bidestilata);
- b. menimbang skim bubuk sebanyak 10 g;
- c. menyiapkan labu didih dan pemanasnya;
- d. menyiapkan aqua bidestilata sebanyak 96 ml dan memasukkan sebagian dalam labu didih;
- e. mencampurkan susu skim dan aqua bidestilata lalu diaduk sampai homogen;
- f. memanaskan di dalam labu didih sampai suhu mencapai 92—95°C selama 12 menit;
- g. mematikan pemanas setelah mencapai suhu 92°C;
- h. mendinginkan larutan skim dan menyimpan di suhu ruang;

b. Pembuatan *buffer* antibiotik

Tahapan proses pembuatan *buffer* antibiotik sebagai berikut;

- a. menyiapkan alat (gelas ukur) dan bahan (penicillin, streptomycin, aquabidestilata, dan larutan *buffer* skim);
- b. mencampurkan streptomycin 0,1 g dan penicillin 1.000 IU, kemudian menambahkan aquabidestilata sampai volume 3 ml;

- c. menghomogenkan larutan, kemudian mencampur larutan *buffer* antibiotik dengan *buffer* skim;
- d. menghomogenkan larutan;
- e. *buffer* skim antibiotik siap digunakan.

Komposisi bahan pengencer susu skim yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi pengencer susu skim

Bahan	Perlakuan					
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Susu Skim (g)	10	10	10	10	10	10
Gliserol (ml)	8	8	8	8	8	8
Fruktosa (g)	1	1	1	1	1	1
Rafinosa (g)	0,5	1	1,5	2	2,5	2,5
Penisillin (100.000 IU/100 ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Streptomisin (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Kuning telur (ml)	5	5	5	5	5	5
Aquabides (ml)	90	90	90	90	90	90

(BIB Lembang 2015)

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

c. Pembuatan pengencer *part A*

Prosedur pembuatan 50 ml pengencer part A sebagai berikut

- a. menyiapkan alat (gelas ukur, kertas saring) dan bahan (*buffer* skim antibiotik, kuning telur);
- b. memasukkan *buffer* skim antibiotik ke dalam gelas ukur sebanyak 47,5 ml;
- c. menyiapkan kuning telur dan memisahkan kuning telur dari putih telur dengan menggunakan kertas saring, selaput kuning telur dipecah dan diambil kuning telurnya kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass*;

- d. menuangkan kuning telur ke dalam gelas ukur yang berisi *buffer* skim antibiotik sebanyak 2,5 ml;
- e. menghomogenkan larutan dengan cara dikocok.

d. Pembuatan pengencer *part B*

Pengencer *part B* terdiri dari gliserol, *buffer* antibiotik, kuning telur, dan fruktosa.

Prosedur pembuatan pengencer *part B* adalah

- a. menyiapkan alat (gelas ukur, beaker glass, kertas saring) dan bahan (gliserol, *buffer* antibiotik, kuning telur, dan fruktosa);
- b. menambahkan *buffer* skim antibiotik sebanyak 38,5 ml ke dalam gelas ukur;
- c. menuangkan gliserol ke dalam gelas ukur sebanyak 8 ml secara perlahan;
- d. menyiapkan kuning telur lalu membersihkan dari putih telur menggunakan kertas saring, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass*;
- e. menambahkan kuning ke dalam gelas ukur yang telah berisi *buffer* skim antibiotik sebanyak 2,5 ml;
- f. menambahkan fruktosa 1 ml ke dalam larutan;
- g. menghomogenkan larutan dengan cara dikocok hingga merata.

Perbandingan pengencer *part A* dan pengencer *part B* dicampurkan dengan perbandingan 1 : 1.

Prosedur pencampuran pengencer susu skim dengan dosis rafinosa berbeda:

- a. pengencer susu skim dibagi menjadi 5 bagian
- b. menambahkan rafinosa sesuai dosis perlakuan (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% dan 3,0%);
- c. mencampur semen segar dengan pengencer;

- d. menyimpan semen yang telah diencerkan di dalam gelas ukur ke dalam *cool top*;
- e. melakukan proses ekuilibrasi selama 4 jam di dalam *cool top*.

(BIB Lembang 2015)

3. Ekuilibrasi

Semen yang telah diencerkan akan melewati proses ekuilibrasi selama 4 jam di dalam *cooltop*. Menurut Toelihere (1993), waktu ekuilibrasi adalah waktu yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian sperma yang berlebih-lebihan dapat dicegah. Semen harus berada di dalam pengencer dengan atau tanpa *glycerol* selama kurang lebih 4 jam pada suhu 5°C (Roberts, 1971 dalam Toelihere, 1993).

Evaluasi setelah ekuilibrasi merupakan *quality control* kedua yang dilakukan setelah selesai proses ekuilibrasi dan dilakukan untuk melihat kemampuan progresif sperma setelah proses ekuilibrasi. Evaluasi setelah ekuilibrasi dilakukan dengan cara mengambil sampel semen yang telah melewati proses ekuilibrasi selama 4 jam. Evaluasi setelah ekuilibrasi dilakukan dengan melakukan pengamatan terhadap motilitas , spermatozoa hidup, dan abnormalitas.

4. Filling dan sealing

Proses *filling* dan *sealing* merupakan proses memasukkan semen yang sudah diencerkan ke dalam *straw* dan lolos evaluasi setelah ekuilibrasi, selain itu pada proses ini *straw* akan diberi label dan *straw* yang telah terisi semen cair akan

disegel dengan sumbat lab. Satu dosis IB berisi 0,25 ml semen dengan konsentrasi sperma 25×10^6 sel/dosis.

5. Proses *prefreezing*

Proses *prefreezing* semen dilakukan di dalam boks yang lengkap dengan rak yang digunakan untuk meletakkan *straw*. Boks yang disediakan diisi dengan nitrogen cair dengan ketinggian nitrogen cair 10 cm. Jarak antara permukaan nitrogen cair dengan *straw* adalah 6 cm. Proses *prefreezing* yaitu mendinginkan *straw* di atas uap nitrogen cair selama 9 menit, kisaran suhu saat proses *prefreezing* mencapai -140°C dan selama proses *freezing* berlangsung boks ditutup untuk mengurangi penguapan nitrogen cair di dalamnya (BIBD Lampung Tengah, 2012).

Evaluasi setelah *prefreezing* merupakan proses evaluasi ketiga dalam proses pembuatan semen beku. Pada evaluasi ini dilihat motilitas individu, spermatozoa hidup, dan abnormalitas.

6. Proses *freezing*

Proses *freezing* dilakukan setelah proses *prefreezing*, *straw* dimasukkan ke dalam nitrogen cair bersuhu -196°C secara perlahan dan dimasukkan ke dalam *goblet* dengan posisi sumbat laboratorium di atas. Setelah proses ini selesai semen beku dapat disimpan di dalam kontainer.

7. *Test after thawing*

Pemeriksaan semen beku dilakukan dengan cara evaluasi setelah *thawing* sebagai *quality control* terakhir. Pemeriksaan ini dilakukan keesokan harinya dengan

mengambil sample *straw* yang beku dan mencelupkan ke dalam air hangat (suhu 37°C) selama 15 detik dengan posisi sumbat pabrik ministraw berada di bagian bawah. Menurut SNI 4869. 1 (2008), semen beku sesudah dicairkan kembali (post thawing) pada suhu antara 37 °C dan 38 °C selama 15 detik sampai dengan 30 detik harus menunjukkan motilitas spermatozoa minimal 40% dan derajat gerakan individu spermatozoa minimal 2 (dua). Evaluasi PTM ini memeriksa motilitas, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa.

E. Peubah yang Diamati

1. Motilitas spermatozoa

Motilitas spermatozoa dilihat dengan cara membuat preparat di atas *object glass* dan meletakkan preparat dibawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 10, melihat gerakan individu sperma dan melakukan penilaian terhadap pergerakan sperma. Motilitas semen sapi yang baik berkisar antara 40—75% (Garner dan Hafez, 2000).

2. Persentase spermatozoa hidup

Persentase spermatozoa hidup dilihat pada preparat ulas yang dibuat dengan cara meneteskan satu tetes *eosin 2%* pada ujung *object glass*, meneteskan semen dengan ukuran yang sama pada *object glass* tersebut, tempelkan ujung *cover glass* pada kedua cairan sehingga cairan tersebut tercampur, kemudian dorong ke ujung *object glass* sehingga terbentuk lapisan tipis, keringkan menggunakan *hairdryer*, setelah kering periksa spermatozoa hidup di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 40. Spermatozoa hidup akan terlihat tidak berwarna dan untuk spermatozoa

mati akan berwarna merah muda atau merah. Spermatozoa dihitung dengan cara berurutan atau zik-zak sampai sepuluh lapang pandang.

Persentase spermatozoa hidup dapat ditentukan dengan rumus :

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

(Mumu, 2009).

3. Abnormalitas spermatozoa

Abnormalitas spermatozoa dapat dilihat pada kepala, badan dan ekornya, jumlah spermatozoa abnormal dihitung dari pemeriksaan sekitar seratus sampai dua ratus spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa dapat dilihat dengan membuat preparat ulas menggunakan eosin 2% lalu diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 10x40.

$$(\%)Abnormalitas = \frac{\text{Jumlah spermatozoa Abnormal}}{\text{Jumlah sel spermatozoa keseluruhan}} \times 100\%$$

(Salmah, 2014)

F. Analisis Data

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

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa:

1. penambahan dosis rafinosa dalam pengencer susu skim tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase motilitas setelah ekuilibrase, persentase motilitas setelah *prefreezing*, persentase spermatozoa hidup setelah ekuilibrase, persentase spermatozoa hidup setelah *prefreezing*, persentase abnormalitas spermatozoa setelah *prefreezing*, dan persentase abnormalitas spermatozoa PTM;
2. penambahan dosis rafinosa dalam bahan pengencer susu skim berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase motilitas spermatozoa PTM berpola regresi linier dengan persamaan $= 25,08 + 4x$, persentase spermatozoa hidup PTM berpola regresi linier dengan persamaan $= 22,55 + 5,77x$ dan persentase abnormalitas spermatozoa setelah ekuilibrase berpola regresi linier dengan persamaan $= 6,36 - 1,71x$.

B. Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap pemberian dosis rafinosa lebih dari 3% dalam pengencer susu skim tanpa penambahan gugus gula lain terhadap motilitas, persentase spermatozoa hidup dan abnormalitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung Tengah. 2012. Standar Operasional Prosedur. BIBD Lampung Tengah. Lampung Tengah
- Balai Inseminasi Buatan Lembang. 2015. Standar Operasional Prosedur (SOP) Produksi Semen Beku. Bandung
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1980. Applied Animal Reproduction, Second Ed. Reston Publishing Company. Reston. Virginia
- Burhan, B., 2003. Panduan Praktis Memilih Produk Daging Sapi. Pt Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Chenoweth, P.J. 2005. Genetic sperm defects. Theriogenology 64: 257-- 468
- Farstad, W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. Anim. Reprod. Sci. (42) 251-- 260
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung
- Garner, D. L and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In : E.S.E, Hafez (Ed.). Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hafez, E. S. E. 1987. Reproduction in Farm Animal. 4th Ed. Lea Febringer
- _____. 1993. Semen Evaluation. In: Hafez, E.S.E. Reproduction in Farm Animals (Eds) 6thEd. Lea and Febiger. Philadelphia
- _____. 2000. Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals. 7th edition. Lippincott Williams 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
- Ihsan, M. N. 1992. Diklat Inseminasi Buatan. Universitas Brawijaya. Malang

- Jones, R. And T. Mann. 1977. Toxicity of exogenous fatty acid peroxides towards spermatozoa. *J.Reprod. Fertil.* (50) : 225--260
- Krystalia, C. 2013. Metabolisme Fruktosa dan Galaktosa. <http://cindy-krystalia.co.id/2013/05/biokimia.html>. Diakses pada 9 Juni 2016
- Maxwell, W.M.C. and S. Salamon. 1993. Liquid Storage of Ram Semen : a review. *Reproduction, Fertility and Development*
- McGilvery, R.W. dan G.W. Goldstein. 1996. Biokimia; Suatu Pendekatan Fungsional. diterjemahkan oleh : Sumarno Dsbk, T.M. Penerbit Airlangga University Press. Surabaya
- Mukminat, A. 2014. Pengaruh Penambahan Berbagai Sumber Karbohidrat Pada Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali. Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung
- Morel DMCG. 1999. Equine Artificial Insemination. Wallingford. Cabi Publish
- Mumu, M. I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simmental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektal Gliserol. Skripsi. Universitas Tadulako. Palu
- Murtidjo, B.A., 1990. Beternak Sapi Potong. Kanisius. Yogyakarta
- Nalbandov, A.V. 1990 Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. UI Press. Jakarta
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Veteriner. Jurusan Reproduksi Institut Pertanian Bogor. Mutiara Sumber Widya. Jakarta
- Rizal, M.A., Herdis, B. Arief, S.A. Achmad, dan Yulnawati. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. Puslitbang Peternakan. Balitbang Pertanian Departemen Pertanian. 11(2):123-130.
- Rizal, M.A dan Herdis. 2008. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 11 (2) : 123-130
- Rudolph, A. S & J. W. Crowe. 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and praline. *Cryobiology* 22 : 367--377
- Salisbury G. W. dan N. L. Van Denmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Diterjemahkan oleh R. Djanuar. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta

- Salmah, N. 2014. Motilitas, Persentase Spermatozoa Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Bali Pada Pengencer Andromed dan Tris Kuning Telur. Skripsi. Universitas Hassanudin. Makassar
- Salamon, S. And W.M.C. Maxwell. 2000. Frozen storage of ram semen processing, freezing, thawing, and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- Sarastina, T. Susilawati, dan G. Ciptadi. 2006. Analisa beberapa parameter motilitas spermatozoa pada berbagai bangsa sapi menggunakan computer assisted semen analysis (casa). *Jurnal Ternak Tropika* (2) : 1--12
- Savitri, O.A., Tuty.Y.Laswardi, D.Sajuthi, dan R.I.Arifiantini. 2014. Kualitas semen kambing peranakan etawa dalam modifikasi pengencer tris dengan trehalosa dan rafinosa. *Jurnal Veteriner*. Vol 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, S. B., 2008. *Penggemukan Sapi*. Penebar Swadaya. Bogor
- SNI 4896.1. 2008. Semen Beku Sapi. Badan Standarisai Nasional (BSN) : Jakarta. sisni.bsn.go.id/index.php?/sni_main/sni/detail_sni/7026. Diakses pada 8 November 2015
- Srigandono, B. 1996. *Kamus Istilah Peternakan*. Edisi Revisi. Gadjah Mada University. Yogyakarta
- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie., 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika (Pendekatan Biometrik)* Penerjemah B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta
- Sugeng, Y.B. 2003. *Sapi Potong*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sugiarti, T., E. Triwlaningsih, 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
- Susilawati, T., P. Srianto, Hermanto dan E. Yuliani. 2013. Inseminasi Buatan dengan Spermatozoa Beku Hasil Sexing pada Sapi untuk Mendapatkan Anak dengan Jenis Kelamin Sesuai Harapan. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang

Toelihere, R.M. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Angkasa

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