



Kualitas Semen dan Kinematik Spermatozoa Kerbau Lumpur yang Diencerkan dengan Bahan Pengencer yang Berbeda

Semen Quality and Kinematics of Swamp Buffalo Sperm Diluted with Different Extenders

Desi Andriani^{1*}, Hendri², Masrizal²

¹ Program Studi Ilmu Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Andalas, Kota Padang, Sumatera Barat 25163

² Dosen Pascasarjana Fakultas Peternakan, Universitas Andalas, Kota Padang, Sumatera Barat 25163

* Corresponding Author. E-mail address: dsandriani11@gmail.com

ARTICLE HISTORY:

Submitted: 25 January 2025

Revised: 24 February 2025

Accepted: 25 February 2025

Published: 1 July 2025

KATA KUNCI:

Bahan pengencer

Kerbau lumpur

Kinematik spermatozoa

Kualitas semen.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bahan pengencer terbaik yang dapat mempertahankan kualitas semen kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato. Penelitian ini menggunakan 1 ekor pejantan kerbau lumpur yang berada di UPTD BPTSD Tuah Sakato. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 6 ulangan, perlakuan yang diberikan adalah perbedaan bahan pengencer yang meliputi P1 (Tris Kuning Telur), P2 (Steridyl), P3 (Bioxcell), dan P4 (Optixcell). Variabel yang diamati pada penelitian ini meliputi kualitas semen segar, semen beku, dan kinematik spermatozoa. Data penelitian dianalisis dengan ANOVA dan uji lanjut DMRT menggunakan aplikasi IBM SPSS v.25. Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan bahan pengencer memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap motilitas dan abnormalitas semen kerbau lumpur, namun tidak berpengaruh signifikan ($P > 0,05$) terhadap viabilitas, MPU, dan TAU spermatozoa ternak kerbau. Perbedaan bahan pengencer memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap ALH spermatozoa kerbau lumpur, namun tidak berpengaruh signifikan ($P > 0,05$) terhadap VAP, VCL, VSL, STR, LIN, dan BCF spermatozoa kerbau lumpur. Berdasarkan hasil penelitian ini ditemukan bahwa tris kuning telur merupakan bahan pengencer terbaik yang dapat mempertahankan kualitas semen kerbau lumpur baik dilihat dari aspek kualitas semen beku maupun kinematik spermatozoa.

ABSTRACT

This study aims to identify the best extender that can maintain the quality of swamp buffalo semen at UPTD BPTSD Tuah Sakato. This study used 1 swamp buffalo bull located at UPTD BPTSD Tuah Sakato. This study used a Completely Randomized Design (CRD) consisting of 4 treatments and 6 replications, the treatments given were differences in diluent materials including P1 (Tris Egg Yolk), P2 (Steridyl), P3 (Bioxcell), and P4 (Optixcell). The variables observed in this study included the quality of fresh semen, frozen semen, and spermatozoa kinematics. The research data were analyzed by ANOVA and DMRT further test using the IBM SPSS v.25 application. The findings of this study indicate that differences in diluent materials have a significant effect ($P < 0.05$) on the motility and abnormality of

KEYWORDS:

Semen Quality,

Artificial Insemination,

Swamp Buffalo,

Tris-Egg Yolk

© 2023 The Author(s). Published by Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, University of Lampung in collaboration with Indonesian Society of Animal Science (ISAS). This is an open access article under the CC BY 4.0 license: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

swamp buffalo semen, but do not have a significant effect ($P > 0.05$) on the viability, MPU, and TAU of swamp buffalo spermatozoa. The difference in diluent materials gave a significant effect ($P < 0.05$) on ALH of swamp buffalo sperm, but did not have a significant effect ($P > 0.05$) on VAP, VCL, VSL, STR, LIN, and BCF of swamp buffalo sperm. Based on the results of this study, it was found that egg yolk tris is the best extender that can maintain the quality of swamp buffalo semen both in terms of frozen semen quality and spermatozoa kinematics.

1. Pendahuluan

Kerbau (*Bubalus bubalis*) merupakan ternak asli berasal dari daerah Tropis (Setiawan, 2022). Indonesia memiliki ternak kerbau terdiri atas dua jenis yaitu kerbau lumpur (swamp buffalo) sebesar 95% dan kerbau sungai (river buffalo) sebesar 5% yang dipelihara secara tradisional dan telah berkembang sejak dahulu, yang tersebar di seluruh wilayah Indonesia (Rusdiana *et al.*, 2020). Kerbau sendiri merupakan salah satu ternak ruminansia yang berperan penting dalam perekonomian peternak terutama peternak kecil.

Tantangan dalam produksi ternak kerbau sendiri adalah masalah reproduksi yang tidak optimal, baik dari segi ternak betina maupun pejantan, sehingga perlu adanya perbaikan dalam sistem reproduksi kerbau termasuk dengan penerapan teknologi reproduksi. Pengembangan teknologi reproduksi ternak telah banyak dilakukan dengan tujuan untuk menyelesaikan masalah minimnya produktivitas ternak (Ohee *et al.*, 2024). Inseminasi buatan (IB) sebagai salah satu solusi yang tepat dalam upaya meningkatkan kinerja reproduksi kerbau lumpur. Sebagaimana disampaikan oleh Yendraliza *et al.*, (2012) bahwa salah satu cara untuk meningkatkan jumlah populasi ternak kerbau adalah melalui menggalakkan teknologi IB.

Pengembangan ternak kerbau dengan teknologi IB memiliki potensi yang besar, namun terdapat kendala pada penerapan IB ternak kerbau di lapangan yaitu kualitas semen beku ternak kerbau yang kurang memadai dibandingkan ternak sapi. Mittal *et al.*, (2019) menyampaikan bahwa aplikasi IB telah dilaporkan dalam skala terbatas pada kerbau, karena kualitas semen beku dan fertilitas kerbau yang rendah jika dibandingkan dengan spermatozoa sapi. Alasan rendahnya tingkat kesuburan pada kerbau di lapangan adalah buruknya karakteristik semen kerbau setelah pencairan (Mittal *et al.*, 2019). Secara khusus, membran plasma spermatozoa kerbau menunjukkan peningkatan konsentrasi asam lemak tak jenuh ganda, terutama asam arakidonat dan

dokosaheksaenoat. Komposisi lipid ini meningkatkan kerentanan terhadap kerusakan peroksidatif yang disebabkan oleh spesies oksigen reaktif (ROS), yang mengakibatkan gangguan fungsi sperma saat dibandingkan dengan sperma sapi (Ros-Santaella dan Pintus, 2021). Fisiologi sperma kerbau yang unik membutuhkan pengencer semen khusus kerbau untuk mengurangi kerusakan akibat pembekuan (Mittal *et al.*, 2019), sehingga untuk mempertahankan kualitas semen kerbau, bahan pengencer merupakan faktor yang sangat penting.

Bahan pengencer atau extender merupakan media kimia yang digunakan untuk pengawetan, pemanjangan umur, dan perlindungan pada sel sperma terhadap berbagai guncangan selama proses pengolahan, penyimpanan, dan pengangkutan yang digunakan untuk IB (Raheja *et al.*, 2018). Media yang digunakan sebagai bahan pengencer harus memiliki sifat-sifat yang meliputi isotonik, kemampuan mempertahankan pH, perlindungan terhadap stress dingin, sumber energi, pengendalian kontaminasi mikroba, perlindungan selama pembekuan dan pencairan, serta mampu mengawetkan spermatozoa (Raheja *et al.*, 2018; Mittal *et al.*, 2019). Bahan pengencer termasuk tris kuning telur, steridil, bioxcell, dan optixcell merupakan bahan pengencer yang telah direkomendasikan untuk pengenceran semen, namun hingga saat ini masih terbatas literatur yang meneliti bahan pengencer untuk semen kerbau.

UPTD BPTSD Tuah Sakato sendiri merupakan produsen semen beku di Sumatera Barat. UPTD BPTSD Tuah Sakato terus berupaya meningkatkan kualitas semen beku ternak kerbau salah satunya dengan menyeleksi berbagai bahan pengencer yang sesuai dengan semen kerbau. Untuk mengevaluasi efektivitas penggunaan berbagai bahan pengencer ini dalam mempertahankan kualitas semen kerbau, maka dilakukan penelitian ini untuk mengidentifikasi bahan pengencer terbaik yang dapat mempertahankan kualitas semen kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato.

2. Materi dan Metode

2.1. Materi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 1 ekor pejantan ternak kerbau lumpur (*swamp buffalo*) yang berumur 4 tahun di UPTD BPTSD Tuah Sakato. Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi satu set vagina buatan, straw, seperangkat Computer-assisted Sperm Analysis (CASA), peralatan produksi semen beku, dan bahan pengencer.

2.2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif yang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan, perlakuan yang diberikan adalah berupa bahan pengencer yang terdiri dari; P1 : Tris Kuning Telur, P2 : Steridyl, P3 : Bioxcell, dan P4 : Optixcell.

2.2.1. Bahan Pengencer

Bahan pengencer yang digunakan meliputi Steridyl, Optixcell, dan Bioxcell yang digunakan adalah bahan pengencer semen yang tersedia secara komersil dan dapat langsung digunakan sebagai bahan pengencer dengan menambahkan aquabides, dengan perbandingan Steridyl 1:1,5, Optixcell 1:4 dan Bioxcell 1:4. Tris kuning telur yang digunakan di produksi sendiri dengan formulasi yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tabel komposisi pengencer tris kuning telur sebanyak 200 ml

No	Bahan	Ukuran
1	a. <i>Tris hydroxymetil aminomethane</i>	6,06 gr
	b. Asam sitrat	3,56 gr
	c. Fruktosa	2,5 gr
	d. <i>Aquabidest</i>	200 ml
2	Krioprotektan	
	a. Kuning telur ayam 20%	50 ml
	b. Gliserol 6%	15 ml
3	Penstrep 200.000 IU: 200 mg/ml	1, 25 ml

Ket: Penstrep (Penisilin dan Streptomisin)

2.2.2. Variabel Penelitian

Pengamatan kualitas semen dan kinematik spermatozoa diamati menggunakan *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA). Variabel yang diamati pada penelitian ini meliputi:

1. Kualitas makroskopis semen segar yang meliputi volume, warna, pH, dan konsistensi.
2. Kualitas mikroskopis semen segar yang meliputi konsentrasi, motilitas, viabilitas, abnormalitas, Membran Plasma Utuh (MPU), dan Tudung Akrosom Utuh (TAU).
3. Kualitas semen beku yang meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, Membran Plasma Utuh (MPU), dan Tudung Akrosom Utuh (TAU).

4. Kinematik spermatozoa yang meliputi velocity average path (VAP), *velocity curve linear* (VCL), *velocity straight line* (VSL), *straightness* (STR), *linearity* (LIN), *amplitude lateral head displacement* (ALH), dan *beat cross frequency* (BCF).

2.2.3. Analisis Data

Data penelitian ini dianalisis dengan Analysis of Variance (ANOVA) dan apabila ditemukan perbedaan yang signifikan pada taraf $P < 0,05$, maka dilakukan uji lanjut Duncan Multiple Range Test (DMRT). Analisis data dilakukan menggunakan software IBM SPSS v.25.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Kualitas Semen Segar Kerbau Lumpur

Kualitas makroskopis semen segar kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato pada penelitian meliputi volume semen segar ditemukan sebesar $2,92 \pm 0,60$ ml. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan penelitian sebelumnya yang menemukan rata-rata volume semen kerbau sebesar $1,66 \pm 0,61$ ml (Ronizar *et al.*, 2021), 0,9 ml (Yendraliza *et al.*, 2019) dan $1,80 \pm 0,67$ ml (Kusumaningrum dan Sianturi, 2017). Warna semen segar kerbau lumpur yang ditemukan pada penelitian ini adalah krem, hasil ini menunjukkan bahwa warna semen kerbau berada pada keadaan normal. Hal ini merujuk pada Hafez dan Hafez, (2013) yang menyatakan bahwa, semen kerbau berwarna krem, krem keputihan atau putih susu.

Tabel 2. Kualitas semen segar kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato

Variabel	Rata-Rata
Makroskopis	
Volume Air Mani (ml)	$2,92 \pm 0,60$
Warna	Krem
pH	$6,41 \pm 0,04$
Konsistensi	Sedang-Kental
Mikroskopis	
Gerakan massa	++-+++
Konsentrasi ($\times 10^6/\text{ml}$)	$2.561,72 \pm 859,40$
Motilitas (%)	$82,33 \pm 2,49$
Viabilitas (%)	$65,27 \pm 0,44$
Abnormalitas (%)	$17,03 \pm 4,20$
Membran Plasma Utuh (MPU) (%)	$90,40 \pm 94,2$
Tudung Akrosom Utuh (TAU) (%)	$88,43 \pm 8,58$

Rata-rata pH semen segar kerbau lumpur ditemukan sebesar $6,41 \pm 0,04$, hasil ini lebih rendah dari temuan sebelumnya yang menemukan pH semen segar kerbau sebesar 7 (Ronizar *et al.*, 2021; Yendraliza *et al.*, 2019). Konsistensi semen segar kerbau lumpur yang ditemukan pada penelitian ini adalah sedang-kental.

Kualitas mikroskopis semen segar kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato meliputi gerakan massa spermatozoa ditemukan berkisar ++-+++, motilitas semen segar kerbau lumpur ditemukan sebesar $82,33 \pm 2,49\%$, hasil penelitian ini lebih tinggi dari temuan sebelumnya yang menemukan rata-rata motilitas semen segar kerbau sebesar $64,34 \pm 7,76\%$ (Ronizar *et al.*, 2021) dan 70% (Yendraliza *et al.*, 2019). Rata-rata viabilitas semen segar kerbau lumpur ditemukan sebesar $65,27 \pm 0,44\%$, temuan penelitian ini lebih rendah dari temuan Kusumaningrum dan Sianturi, (2017) yang menemukan viabilitas semen segar kerbau sebesar $87,93 \pm 4,76\%$, namun hasil penelitian ini lebih tinggi dari temuan Ronizar *et al.* (2021) yang menemukan viabilitas semen segar kerbau sebesar $56,23 \pm 7,39\%$.

Hasil penelitian ini ditemukan rata-rata abnormalitas semen segar kerbau lumpur sebesar $17,03 \pm 4,20\%$, temuan ini lebih tinggi dari penelitian Yendraliza *et al.* (2019) yang menemukan abnormalitas semen segar kerbau sebesar 11%, namun lebih rendah dari temuan Ronizar *et al.* (2021) yang menemukan abnormalitas semen segar kerbau sebesar $20,24 \pm 1,90\%$.

Rata-rata konsentrasi semen segar kerbau lumpur ditemukan sebesar $2.561,72 \pm 859,40 \times 10^6/\text{ml}$, hasil ini lebih tinggi dari temuan sebelumnya yang menemukan konsentrasi semen segar kerbau sebesar $1983 \pm 283 \times 10^6/\text{ml}$ (Kusumaningrum dan Sianturi, 2017). Rata-rata MPU semen segar kerbau lumpur yang ditemukan pada penelitian ini sebesar $90,40 \pm 94,2\%$ dan rata-rata TAU semen segar kerbau lumpur ditemukan sebesar $88,43 \pm 8,58\%$. Hasil ini lebih tinggi dari temuan sebelumnya yang menemukan nilai MPU semen segar kerbau sebesar 68% (Yendraliza *et al.*, 2019), $73,00 \pm 8,60\%$ (Kusumaningrum dan Sianturi, 2017), dan TAU $81,59 \pm 3,65\%$ (Kusumaningrum dan Sianturi, 2017).

Kualitas semen segar kerbau dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor baik faktor genetik maupun non genetik. Kaka *et al.* (2016) menyampaikan bahwa perbedaan kualitas semen kerbau dapat disebabkan oleh berbagai faktor termasuk usia, musim, pakan, serta genetik. Peneliti lain menyampaikan bahwa variasi kualitas semen pada

kerbau mungkin disebabkan oleh perbedaan usia, berat badan, musim, serta frekuensi pengumpulan semen (Ghudasara *et al.*, 2016).

3.2. Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur

Kualitas semen beku kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato yang diencerkan dengan berbagai bahan pengencer dapat dilihat pada Tabel 3. Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan bahan pengencer memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap motilitas dan abnormalitas semen kerbau lumpur, namun tidak berpengaruh signifikan ($P > 0,05$) terhadap viabilitas, MPU, dan TAU.

Tabel 3. Kualitas semen beku kerbau lumpur yang diencerkan dengan berbagai bahan pengencer

Variabel	Bahan Pengencer			
	Tris Kuning Telur	Steridil	Bioxcell	Optixcell
Motilitas (%)	68,86±6,91 ^a	58,35±9,61 ^b	58,14±6,93 ^b	54,91±6,43 ^b
Viabilitas (%)	82,33±2,96	83,02±4,21	78,87±6,21	78,20±9,82
Abnormalitas (%)	14,78±3,84 ^b	19,79±1,72 ^{bc}	7,58±5,16 ^a	21,34±7,64 ^c
MPU (%)	91,04±5,62	93,32±2,79	89,59±4,52	91,95±2,13
TAU (%)	86,17±6,96	87,58±8,74	87,53±4,55	88,80±5,91

Ket: Superskrip yang berbeda (^{abc}) pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$).

Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa motilitas semen beku ternak kerbau tertinggi ditemukan pada pengencer berbasis tris kuning telur yaitu sebesar 68,86±6,91%, lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan bahan pengencer berbasis steridyl, bioxcell, dan optixcell. Motilitas semen kerbau pada penelitian ini lebih rendah dari temuan Saaban *et al.* (2019) yang menemukan rata-rata motilitas semen kerbau sebesar 78,18±3,37%, namun lebih tinggi dari temuan Kaiin *et al.*, (2017) yang menemukan motilitas semen kerbau sebesar 43.25%. Motilitas sperma merupakan parameter paling penting untuk mengevaluasi potensi kesuburan pejantan. Sel sperma harus memiliki motilitas sperma yang tinggi untuk memastikan potensi kesuburan maksimum (Amann dan Waberski, 2014). Lebih jauh, motilitas sperma sangat penting untuk pembuahan (Berg *et al.*, 2018). Sperma yang tidak motil dan gangguan motilitas sperma merupakan indikator penting infertilitas pejantan (Longobardi *et al.*, 2017). Oleh karena itu, motilitas yang memenuhi standar merupakan faktor penting dalam kesuburan pejantan (Puglisi *et al.*, 2017; Vyklicka dan Lishko, 2020).

Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa pengencer tris kuning telur dapat mempertahankan kualitas semen kerbau lebih baik dibandingkan pengencer lain. Hal ini disebabkan oleh kemampuan bahan pengencer ini dalam mempertahankan kualitas semen selama proses pembekuan. Kuning telur merupakan zat non-penetrasi utama yang digunakan dalam pengencer untuk mengencerkan semen dan melindungi sperma selama proses pembekuan (Bustani dan Baiee, 2021). Lebih jauh, kandungan pada pengencer kuning telur dilaporkan mencegah hilangnya fosfolipid membran selama proses pembekuan (Layek *et al.*, 2016). Pengencer tris kuning telur diidentifikasi mengandung lipoprotein densitas rendah (LDL) yang dapat melindungi spermatozoa dari proses pembekuan dan meningkatkan motilitas sperma, selain itu LDL dapat melindungi membran sperma dengan melibatkan membran sel selama proses pembekuan-pencairan (Abdel-Khalek *et al.*, 2018).

Pengenceran semen kerbau dengan tris kuning telur dilaporkan dapat meningkatkan motilitas semen hingga 27,33% (Chuawongboon *et al.*, 2017). Tris kuning telur juga dapat berperan dalam meningkatkan kapasitas antioksidan mempertahankan semen dari ROS. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bassuony *et al.* (2023) bahwa tris kuning telur juga diidentifikasi dapat meningkatkan kapasitas antioksidan, penurunan peroksidasi lipid, motilitas, dan memiliki sifat antioksidan terhadap ROS dan radikal bebas terhadap semen kerbau (Ramazani *et al.*, 2023), sehingga dapat mempertahankan motilitas semen kerbau lebih baik dibandingkan bahan pengencer lain.

Hasil penelitian ini menunjukkan viabilitas semen tidak berbeda secara signifikan ($P>0,05$) pada semua bahan pengencer. Viabilitas semen tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer steridyl yaitu $83,02\pm4,21\%$ dan yang terendah ditemukan pada bahan pengencer optixcel yaitu $78,20\pm9,82\%$. Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan temuan sebelumnya, dimana rata-rata viabilitas semen kerbau adalah $81,73\pm3,69\%$ (Saaban *et al.*, 2019) dan 79.4% (Kaiin *et al.*, 2017). Viabilitas sel sperma merupakan aspek penting dari kualitas ejakulasi yang menentukan keberhasilan fertilisasi kompetitif, yang sebanding dengan sperma hidup (Kumaresan *et al.*, 2017). Viabilitas spermatozoa sangat penting untuk motilitas dan kemampuan pembuahan. Penurunan viabilitas sperma berdampak pada kemampuan spermatozoa untuk menginduksi pembuahan akan menurun (Kumaresan *et al.*, 2017).

Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas semen tertinggi adalah pada bahan pengencer steridyl dan tris kuning telur. Steridyl merupakan bahan pengencer berbasis kuning telur sehingga memiliki kemampuan dan kandungan yang tidak jauh berbeda dengan pengencer tris kuning telur. Steridyl adalah pengencer sapi berbasis tris kuning telur yang tersedia secara komersial dan mengandung 15% kuning telur (Hermes *et al.*, 2022), sehingga efektivitasnya dalam mempertahankan kualitas semen kerbau tidak jauh berbeda dengan tris kuning telur. Peran pengencer berbasis kuning telur dalam kriopreservasi sperma adalah sebagai faktor resistensi, yang membantu melindungi spermatozoa terhadap stress dingin, dan faktor penyimpanan, yang membantu mempertahankan viabilitas (Nikitkina *et al.*, 2020). Kandungan fosfolipid, kolesterol, dan lipoprotein densitas rendah dari kuning telur telah diidentifikasi sebagai komponen pelindung (Nikitkina *et al.*, 2020), sehingga dapat melindungi viabilitas semen kerbau.

Abnormalitas semen beku ternak kerbau terendah ditemukan pada pengencer berbasis bioxcell yaitu sebesar $7,58 \pm 5,16\%$, lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan bahan pengencer berbasis tris kuning telur ($14,78 \pm 3,84\%$), steridil ($19,79 \pm 1,72\%$) dan optixcel ($21,34 \pm 7,64$). Secara keseluruhan hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menemukan rata-rata abnormalitas spermatozoa kerbau sebesar 16,00-17,10% (Afriyani *et al.*, 2021) dan 17% (Kaiin *et al.*, 2017). Abnormalitas spermatozoa merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan keberhasilan fertilisasi oleh spermatozoa. Pejantan subfertil atau infertil ditandai dengan motilitas sperma yang buruk, jumlah spermatozoa abnormal yang tinggi, atau spermatozoa dengan daya beku yang tidak memadai (Binsila *et al.*, 2018). Abnormalitas spermatozoa ternak kerbau telah dilaporkan berhubungan dengan kesuburan pejantan (Ahmed *et al.*, 2016). Hal ini dapat terjadi karena proses kriopreservasi dapat meningkatkan kelainan sperma terutama kelainan ekor (Ahmed *et al.*, 2016), sehingga dapat mempengaruhi kesuburan spermatozoa kerbau. Penanganan semen setelah ejakulasi dapat berdampak pada abnormalitas spermatozoa (Bustani dan Baiee, 2021). Sehingga penggunaan bahan pengencer yang tepat merupakan salah satu faktor yang menentukan persentase abnormalitas spermatozoa kerbau.

Temuan penelitian ini menunjukkan bioxcell dapat mempertahankan spermatozoa dalam kondisi normal lebih baik dari bahan pengencer lain, namun rata-rata abnormalitas spermatozoa kerbau yang ditemukan pada semua bahan pengencer masih

dapat ditoleransi (Afriyani *et al.*, 2021; Kaiin *et al.*, 2017). Bioxcell merupakan bahan pengencer semen yang berbasis lesitin (Murphy *et al.*, 2017). Lesitin adalah fosfolipid yang tersebar luas di tumbuhan dan memainkan peran penting dalam regulasi biomembran (Üstüner *et al.*, 2014). Lesitin kedelai berintegrasi dengan membran sperma untuk membentuk lapisan pelindung terhadap pembentukan kristal es intraseluler yang mematikan dan melindungi membran sperma dari kerusakan mekanis selama proses pembekuan-pencairan (Üstüner *et al.*, 2014). Bioxcell diidentifikasi dapat mempertahankan abnormalitas spermatozoa terutama pada suhu 5°C, namun bahan pengencer ini terbatas karena berjalan lebih efektif hanya dalam waktu hingga 24 jam (Fernandez-Novo *et al.*, 2021), sehingga perlu pertimbangan kembali untuk memanfaatkannya sebagai bahan pengencer semen ternak kerbau.

MPU spermatozoa tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer steridyl yaitu $93,32 \pm 2,79\%$ dan yang terendah ditemukan pada bahan pengencer bioxcell yaitu $89,59 \pm 4,52\%$. Hasil penelitian ini lebih tinggi dari temuan sebelumnya yang menemukan MPU spermatozoa kerbau sebesar $86,64 \pm 7,24\%$ (Saaban *et al.*, 2019) dan 74,5% (Kusumaningrum dan Sianturi, 2017). Selama kriopreservasi, sel sperma mengalami stres intraseluler dan ekstraseluler yang mengakibatkan gangguan membran, reorganisasi lipid/protein membran, dan perubahan osmotik di seluruh membran (Singh *et al.*, 2018). Membran plasma spermatozoa merupakan tempat utama yang lebih rentan selama kriopreservasi yang mengalami peroksidasi lipid dan keluarnya kolesterol akibat ROS, dan dapat mengganggu komposisi lipidnya (Venkatesh *et al.*, 2024), sehingga komposisi media kriopreservasi yang optimal sangat penting untuk menjaga kualitas semen pasca-pencairan (Venkatesh *et al.*, 2024).

Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa keempat bahan pengencer yang digunakan memiliki kemampuan yang tidak jauh berbeda dalam mempertahankan MPU spermatozoa kerbau. Hal ini juga dikonfirmasi oleh para peneliti sebelumnya bahwa keempat bahan pengencer ini dapat berperan dalam menjaga MPU spermatozoa. Optixcell sebelumnya dilaporkan secara signifikan meningkatkan persentase spermatozoa dengan membran plasma utuh setelah kriopreservasi (Naz *et al.*, 2018), termasuk pada ternak kerbau (Ansari *et al.*, 2016). Demikian pula bioxcell juga dilaporkan dapat mempertahankan MPU spermatozoa, namun terbatas dalam waktu 24 jam (Fernandez-Novo *et al.*, 2021). Bahan pengencer berbasis kuning telur termasuk

steridyl juga ditemukan dapat mencegah hilangnya fosfolipid membran selama proses pembekuan (Ashrafi *et al.*, 2019). Protein kuning telur memiliki sifat hidrofobik, yang tidak dapat menembus dinding sel sperma. Lipoprotein densitas rendah (LDL) dari kuning telur mempertahankan fosfolipid membran sperma selama proses kriopreservasi (Layek *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2020), sehingga dengan pemanfaatan 4 bahan pengencer ini tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada MPU spermatozoa kerbau.

TAU spermatozoa tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer optixcell yaitu $88,80 \pm 5,91\%$ dan yang terendah ditemukan pada bahan pengencer tris kuning telur yaitu $86,17 \pm 6,96\%$. Hasil penelitian ini lebih tinggi dari temuan sebelumnya yang menemukan TAU spermatozoa kerbau sebesar $82,73 \pm 6,99\%$ (Saaban *et al.*, 2019) dan 48,8 % (Kusumaningrum dan Sianturi, 2017). TAU merupakan faktor penting bagi kemampuan sel spermatozoa untuk menjalani kapasitas, reaksi akrosom, disamping itu peristiwa pembuahan memerlukan akrosom yang utuh pada saat ejakulasi dan setelah proses pembekuan-pencairan (Bustani dan Baiee, 2021). Gangguan atau kerusakan pada akrosom dapat mengakibatkan hilangnya isi akrosom sebelum waktunya, yang pada akhirnya menyebabkan kegagalan pembuahan (Yousef *et al.*, 2020). Selain itu, akrosom yang rusak tidak mengalami vesikulasi dengan benar, tetapi pecah secara spontan dan menyebabkan pembuahan yang tidak sempurna (Chen *et al.*, 2017).

Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa TAU spermatozoa kerbau lumpur yang diencerkan dengan tris kuning telur, steridyl, bioxcell, dan optixcell tidak jauh berbeda, hal ini menunjukkan bahwa keempat bahan pengencer ini mempunyai kemampuan yang tidak jauh berbeda dalam mempertahankan TAU spermatozoa kerbau. Bioxcel merupakan bahan pengencer berbasis lesitin dan optixcell merupakan bahan pengencer berbasis liposom. Peneliti terdahulu mengkonfirmasi bahwa kedua bahan pengencer ini memiliki efisiensi krioprotektif yang sama pada semen sapi dan kerbau (Ansari *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2015). Pengencer berbasis kuning telur juga berfungsi sebagai tempat penyimpanan kolesterol dan fosfolipid yang membantu melindungi membran sel sperma dan akrosom dari cedera kriogenik (Bustani dan Baiee, 2021). Hasil ini menunjukkan bahwa keempat bahan pengencer yang digunakan memiliki kemampuan yang baik dalam mempertahankan TAU spermatozoa kerbau. Krioproteksi oleh bahan pengencer dapat menstabilkan spermatozoa terhadap efek dingin, sehingga

meminimalkan besarnya kerusakan pada akrosom selama proses pembekuan-pencairan (Naz *et al.*, 2018).

Secara keseluruhan pada penelitian ini, pengenceran semen kerbau menggunakan tris kuning telur ditemukan menunjukkan hasil terbaik berdasarkan pertimbangan semua variabel kualitas semen. Hal ini juga dikonfirmasi oleh peneliti sebelumnya bahwa pengenceran semen kerbau dengan tris kuning telur dapat mencegah penurunan peroksidasi lipid, motilitas, viabilitas, fungsionalitas membran plasma dan memiliki sifat antioksidan terhadap ROS dan radikal bebas terhadap semen kerbau (Ramazani *et al.*, 2023). Pengenceran dengan pengencer yang tepat dapat meningkatkan kualitas semen pasca-pencairan dengan menyediakan lingkungan pelindung bagi sperma selama pembekuan dan pencairan (Das *et al.*, 2023).

Peneliti terdahulu juga telah menyarankan bahwa tris kuning telur dinilai paling cocok untuk pengenceran semen kerbau (Chaudhari *et al.*, 2015; Naz *et al.*, 2018; Naz *et al.*, 2019). Nain *et al.* (2023) menyampaikan bahwa tris kuning telur dapat meningkatkan motilitas pasca-pencairan (PTM), viabilitas, respons HOST, serta integritas akrosom semen kerbau. Venkatesh *et al.*, (2024) menyampaikan peningkatan kompetensi fungsional spermatozoa kerbau dengan meningkatkan motilitas pasca-pencairan dan indeks viabilitas serta dengan mengurangi cacat akrosom dengan penggunaan pengencer tris kuning telur. Kumar *et al.* (2019) juga menemukan manfaat positif pemanfaatan tris kuning telur sebagai bahan pengencer dalam melindungi semen kerbau selama proses kriopreservasi termasuk mencegah pembentukan radikal bebas, membersihkan radikal bebas berlebih, menjaga fluiditas membran plasma sperma, dan meningkatkan kapasitas antibakteri pengencer semen.

3.3. Kinematik Spermatozoa Kerbau Lumpur

Kinematik Spermatozoa kerbau lumpur di UPTD BPTSD Tuah Sakato yang diencerkan dengan berbagai bahan pengencer dapat dilihat pada Tabel 4. Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan bahan pengencer memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) terhadap ALH spermatozoa kerbau lumpur, namun tidak berpengaruh signifikan ($P > 0,05$) terhadap VAP, VCL, VSL, STR, LIN, dan BCF spermatozoa kerbau lumpur.

Tabel 4. Kinematik spermatozoa kerbau lumpur

Variabel	Bahan Pengencer			
	Steridil	Optixcell	Bioxcell	Tris Kuning Telur
VAP ($\mu\text{m/s}$)	58,14 $\pm$ 9,97	53,76 $\pm$ 7,34	56,59 $\pm$ 16,22	53,41 $\pm$ 27,97
VCL ($\mu\text{m/s}$)	76,36 $\pm$ 16,65	74,41 $\pm$ 24,63	81,25 $\pm$ 14,51	80,35 $\pm$ 7,33
VSL ($\mu\text{m/s}$)	32,77 $\pm$ 10,90	42,37 $\pm$ 6,85	45,17 $\pm$ 17,63	41,10 $\pm$ 9,18
STR (%)	81 $\pm$ 0,8	79 $\pm$ 0,3	78 $\pm$ 0,77	76 $\pm$ 0,4
LIN (%)	61 $\pm$ 1,4	56 $\pm$ 0,6	54 $\pm$ 1,1	51 $\pm$ 0,7
ALH (μm)	3,42 $\pm$ 0,82 ^a	4,02 $\pm$ 0,57 ^b	4,56 $\pm$ 0,48 ^b	4,40 $\pm$ 0,63 ^b
BCF (Hz)	25,13 $\pm$ 3,49	23,40 $\pm$ 0,72	22,56 $\pm$ 3,66	22,25 $\pm$ 3,04

Ket: Superskrip yang berbeda (^{ab}) pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan antara bahan pengencer dengan semua parameter kecepatan spermatozoa (VAP, VCL, dan VSL). Nilai rata-rata VAP tertinggi ditemukan pada bahan pengencer steridyl yaitu 58,14 $\pm$ 9,97 $\mu\text{m/s}$, nilai rata-rata VCL tertinggi ditemukan pada bahan pengencer bioxcell yaitu 81,25 $\pm$ 14,51 $\mu\text{m/s}$, dan nilai rata-rata VSL tertinggi ditemukan pada bahan pengencer bioxcell yaitu 45,17 $\pm$ 17,63 $\mu\text{m/s}$. Temuan ini tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya pada kerbau mesir yang menemukan rata-rata nilai VAP 44,2 $\pm$ 1,5 $\mu\text{m/s}$, VCL 71,4 $\pm$ 2,4 $\mu\text{m/s}$, dan VSL 35,9 $\pm$ 1,5 $\mu\text{m/s}$ (Dessouki *et al.*, 2022). Penelitian lain pada kerbau murah menemukan rata-rata nilai VAP 33,35 $\pm$ 0,72 $\mu\text{m/s}$, VCL 72,26 $\pm$ 0,83 $\mu\text{m/s}$, dan VSL 27,29 $\pm$ 0,83 $\mu\text{m/s}$ (Chaturvedi *et al.*, 2021).

Penelitian ini ditemukan bahwa parameter kecepatan spermatozoa kerbau lumpur pada semua bahan pengencer berada pada kondisi yang baik. Hal ini merujuk kepada Suzuki *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa nilai VAP $>25,0$ $\mu\text{m/s}$ menunjukkan adanya motilitas progresif spermatozoa dan Binsila *et al.*, (2021) yang menyatakan bahwa VCL dapat dikelompokkan menjadi 4 yaitu <10 tidak motil, 10–35 lambat, 35–60 sedang dan >60 cepat. Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa semua bahan pengencer dapat mempertahankan VAP, VCL, dan VSL spermatozoa selama proses pembekuan. Hal ini sejalan dengan Kumar *et al.* (2015) bahwa nilai parameter kecepatan spermatozoa yang berada pada kategori baik menunjukkan kemampuan yang baik pada bahan pengencer dan kerusakan yang lebih sedikit selama proses pembekuan. Selama proses pembekuan dan pencairan, parameter kinematika ini merupakan yang paling sensitif perubahan fisik dan biokimia spermatozoa kerbau (Sohail *et al.*, 2013).

Nilai VAP, VCL, dan VSL spermatozoa pada penelitian ini menunjukkan bahwa semua bahan pengencer dapat mempertahankan spermatozoa kerbau pada fertilitas yang baik. Hal ini karena diantara karakteristik spermatozoa, parameter motilitas progresif dan kecepatan (VCL, VSL dan VAP) dapat digunakan untuk memprediksi fertilitas spermatozoa jantan (Kathiravan *et al.*, 2011; Sohail *et al.*, 2013). Singh *et al.* (2017), melakukan penelitian pada kerbau Murrah, dan menyatakan bahwa nilai VAP, VSL, dan VCL lebih tinggi pada kerbau yang menunjukkan karakteristik fertilitas tinggi dibandingkan kerbau yang menunjukkan karakteristik fertilitas rendah. Kemampuan bahan pengencer ini dalam mempertahankan kualitas spermatozoa kerbau selama pembekuan juga telah dilaporkan oleh para peneliti terdahulu, baik steridyl, tris kuning telur (Dalal *et al.*, 2020), bioxcell (Fernandez-Novo *et al.*, 2021), maupun optixcell (Naz *et al.*, 2018). Berdasarkan hal tersebut parameter kecepatan spermatozoa pada penelitian ini menunjukkan kategori fertilitas yang baik.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan antara bahan pengencer dengan STR, LIN, dan BCF, namun terdapat pengaruh pada parameter ALH. Meskipun demikian, ALH telah dilaporkan tidak memiliki korelasi dengan fertilitas spermaozoa (Kathiravan *et al.*, 2011). Nilai rata-rata STR spermatozoa tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer steridil yaitu $81 \pm 0,8\%$, nilai rata-rata LIN spermatozoa tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer steridil yaitu $61 \pm 1,4\%$, nilai rata-rata ALH spermatozoa tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer bioxcel yaitu $4,56 \pm 0,48 \mu\text{m}$, dan nilai rata-rata BCF spermatozoa tertinggi pada penelitian ini ditemukan pada bahan pengencer steridil yaitu $25,13 \pm 3,49 \text{ Hz}$. Penelitian sebelumnya pada kerbau ditemukan rata-rata LIN $37,89 \pm 0,98 \%$, STR $74,65 \pm 1,00 \%$, ALH $1.50 \pm 0.04 \mu\text{m}$, dan BCF $8,94 \pm 0,33 \text{ Hz}$ (Chaturvedi *et al.*, 2021). Penelitian lain pada ternak kerbau menemukan rata-rata LIN $45.89 \pm 10.78 \%$, STR $64.57 \pm 7.59 \%$, ALH $23.53 \pm 0.73 \mu\text{m}$, dan BCF $6.26 \pm 0.36 \text{ Hz}$ (Miraz *et al.*, 2022).

Nilai LIN dan STR dapat digunakan sebagai indikator motilitas progresif dan pola renang spermatozoa (Raafi *et al.*, 2021), demikian juga BCF merupakan karakteristik sel semen yang berguna dalam memperkirakan perubahan kasar pada pola denyut flagela spermatozoa (Kumar *et al.*, 2015). Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa semua bahan pengencer memiliki kemampuan yang tidak jauh berbedaa dalam

mempertahankan kinematik spermatozoa. Naz *et al.* (2018) mengungkapkan bahwa optixcel dapat mempertahankan ALH, BCF, STR, dan LIN spermatozoa kerbau. Pengencer berbasis kuning telur (tris kuning telur dan steridil) juga ditemukan dapat mempertahankan STR, LIN, ALH, dan BCF, yang menunjukkan bahwa spermatozoa yang diawetkan dalam bahan pengencer ini memiliki struktur flagela yang lebih efisien (Abdel-Aziz *et al.*, 2019; Maleki *et al.*, 2023). Bahan pengencer bioxcel juga telah dikonfirmasi dapat mempertahankan nilai kinematik spermatozoa, namun kemampuan bahan pengencer ini ditemukan terbatas hingga 24 jam setelah pembekuan (Fernandez-Novo *et al.*, 2021). Berdasarkan hal tersebut, nilai kinematik spermatozoa ternak kerbau pada penelitian ini tidak jauh berbeda antara semua bahan pengencer.

4. Kesimpulan

Temuan penelitian ini mengantarkan penulis pada kesimpulan bahwa tris kuning telur merupakan bahan pengencer terbaik yang dapat mempertahankan kualitas semen kerbau lumpur baik dilihat dari aspek kualitas semen beku maupun kinematik spermatozoa. Pengenceran semen kerbau lumpur dengan tris kuning telur menghasilkan kualitas semen meliputi motilitas $68,86 \pm 6,91\%$, viabilitas $82,33 \pm 2,96\%$, abnormalitas $14,78 \pm 3,84\%$, MPU $91,04 \pm 5,62\%$, dan TAU $86,17 \pm 6,96\%$. Nilai kinematik spermatozoa dengan tris kuning telur meliputi VAP $53,41 \pm 27,97 \mu\text{m/s}$, VCL $80,35 \pm 7,33 \mu\text{m/s}$, VSL $41,10 \pm 9,18 \mu\text{m/s}$, STR $76 \pm 0,4 \%$, LIN $51 \pm 0,7 \%$, ALH $4,40 \pm 0,63 \mu\text{m}$, dan BCF $22,25 \pm 3,04 \text{ Hz}$. Hasil penelitian ini masih terbatas karena keterbatasan jumlah pejantan kerbau lumpur yang tersedia, sehingga disarankan untuk penelitian lebih lanjut dengan sampel pejantan yang lebih dari 1 ekor.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada pengelola UPTD Balai Pengembangan Teknologi dan Sumber Daya (BPTSD) Tuah Sakato Sumatera Barat yang telah memberikan bantuan dan fasilitas selama penelitian berlangsung.

Daftar Pustaka

Abdel-Aziz, A. S., M. Saadeldin, I., Ba-Awadh, H., G. Al-Mutary, M., F. Moumen, A., N. Alowaimer, A., and Abdalla, H. 2019. Efficiency of commercial egg yolk-free and egg yolk-supplemented tris-based extenders for dromedary camel semen cryopreservation. *Animals*, 9(11), 999. DOI : <https://doi.org/10.3390/ani9110999>

- Abdel-Khalek, A., Khalil, W., El-Saidy, B., and Yousif, A. 2018. Effect of some alternative components of egg yolk in tris-extender on sperm characteristics of ram semen frozen with two methods of packaging semen. *Journal of Animal and Poultry Production*, 9(1), 33-40. DOI : <https://dx.doi.org/10.21608/jappmu.2018.35782>.
- Afriyani, T., Satriyen, R., Jaswandi, J., Roza, E., Rastosari, A., dan Farhana, A. 2021. Penambahan kandungan rafinosa pada bahan ekstender tris kuning telur itik terhadap performa semen beku kerbau. In *Conference of Applied Animal Science Proceeding Series (Vol. 2)*. DOI : <https://doi.org/10.25047/animpro.2021.8>
- Ahmed, H., Andrabi, S. M. H., and Jahan, S. 2016. Semen quality parameters as fertility predictors of water buffalo bull spermatozoa during low-breeding season. *Theriogenology*, 86(6), 1516-1522. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.010>
- Amann, R. P., and Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.004>
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Akhter, S., and Ashiq, M. 2016. OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*, 85(3), 528-532. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.035>
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., and Akhter, S. 2017. Cryopreservation of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in AndroMed® extender; in vitro and in vivo evaluation. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 992-997. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.035>
- Ashrafi, I., Kia, H. D., and Parrish, J. 2019. Egg yolk saline soluble fraction was as efficient as ammonium sulfate insoluble yolk fraction in cryopreservation of bull semen in comparison with whole egg yolk. *Rev. Med. Vet*, 170(4-6), 104-109. DOI : https://www.revmedvet.com/2019/RMV170_104_109.pdf.
- Berg, H. F., Kommisrud, E., Bai, G., Gaustad, E. R., Klinkenberg, G., Standerholen, F. B., ... and Alm-Kristiansen, A. H. 2018. Comparison of sperm adenosine triphosphate content, motility and fertility of immobilized and conventionally cryopreserved Norwegian Red bull semen. *Theriogenology*, 121, 181-187. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.08.016>
- Bassuony, N. I., Assi, M. M., Sakr, A. A., Bakr, A. A., Anwar, D. A., and Badr, M. R. 2023. Effect of Bioactive Compounds of Lemon, Onion and Garlic Extract on Buffalo Semen Quality, Antioxidant Status and Ultrastructure Changes. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 76(1). DOI : <https://doi.org/10.5455/ajvs.124422>
- Binsila, B. K., Selvaraju, S., Somashekar, L., Archana, S. S., Arangasamy, A., Ravindra, J. P., and Bhatta, R. 2018. Molecular advances in semen quality assessment and improving fertility in bulls-a review. *The Indian Journal of Animal Reproduction*, 39(1), 1-10. DOI : <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03303-9>
- Binsila, B. K., Archana, S. S., Ramya, L., Swathi, D., Selvaraju, S., Gowda, N. S., ... and Bhatta, R. 2021. Elucidating the processes and pathways enriched in buffalo sperm proteome in regulating semen quality. *Cell and tissue research*, 383, 881-903. DOI : <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03303-9>.

- Bustani, G. S., and Baiee, F. H. 2021. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220. DOI : <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
- Chaudhari, D. V., Dhami, A. J., Hadiya, K. K., and Patel, J. A. 2015. Relative efficacy of egg yolk and soya milk-based extenders for cryopreservation (– 196 C) of buffalo semen. *Veterinary world*, 8(2), 239. DOI : <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.239-244>
- Chaturvedi, D., Dhami, A. J., and Chaudhari, D. V. 2021. Interrelationships among sperm quality parameters, cryocapacitation status, oxidative markers and CASA traits of fresh and frozen-thawed semen of Gir and Murrah bulls. *Indian Journal of Veterinary Sciences and Biotechnology*, 17(4), 54-60. DOI : <https://doi.org/10.21887/ijvsbt.17.4.12>.
- Chen, B., Li, S., Yan, Y., Duan, Y., Chang, S., Wang, H., ... and Si, W. 2017. Cryopreservation of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) sperm with glycerol and ethylene glycol, and its effect on sperm-specific ion channels—CatSper and Hv1. *Theriogenology*, 104, 37-42. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.009>
- Chuawongboon, P., Sirisathien, S., Pongpeng, J., Sakhong, D., Nagai, T., and Vongpralub, T. 2017. Effects of supplementation of iodixanol to semen extender on quality and fertilization ability of frozen–thawed Thai native bull sperm. *Animal Science Journal*, 88(9), 1311-1320. DOI : <https://doi.org/10.1111/asj.12798>
- Dalal, J., Chandolia, R. K., Pawaria, S., Kumar, A., Kumar, D., Selokar, N. L., ... and Kumar, P. 2020. Low-density lipoproteins protect sperm during cryopreservation in buffalo: Unraveling mechanism of action. *Molecular Reproduction and Development*, 87(12), 1231-1244. DOI : <https://doi.org/10.1002/mrd.23434>
- Dessouki, S. M., Ahmed, D. A. E. R., and Fayed, A. K. 2022. Sperm kinetics of Egyptian buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) affected by the red laser postfreezing. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 9(3), 396. DOI : <https://doi.org/10.5455/javar.2022.i607>
- Fernandez-Novio, A., Santos-Lopez, S., Barrajon-Masa, C., Mozas, P., de Mercado, E., Caceres, E., ... and Perez-Garnelo, S. S. 2021. Effect of extender, storage time and temperature on kinetic parameters (CASA) on bull semen samples. *Biology*, 10(8), 806. DOI : <https://doi.org/10.3390/biology10080806>
- Fernandez-Novio, A., Santos-Lopez, S., Barrajon-Masa, C., Mozas, P., de Mercado, E., Caceres, E., ... and Perez-Garnelo, S. S. 2021. Effects of extender type, storage time, and temperature on bull semen parameters. *Biology*, 10(7), 630. DOI : <https://doi.org/10.3390/biology10070630>
- Ghodasara, S. N., Gajbhiye, P. U., Ahlawat, A. R., and Murthy, K. S. 2016. Evaluation of fresh semen quality and predicting the number of frozen semen doses in Jaffrabadi buffalo bull. *Buffalo bulletin*, 35(1), 65-72. <http://kuojs.lib.ku.ac.th/index.php/BufBu/article/view/1146>.
- Hafez, E. S. E., and Hafez, B. 2013. *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons. USA.
- Hermes, R., Lecu, A., Potier, R., Goeritz, F., Rickard, J. P., Bohner, J., ... and Hildebrandt, T. B. 2022. Cryopreservation of giraffe epididymal spermatozoa using different extenders and cryoprotectants. *Animals*, 12(7), 857. DOI : <https://doi.org/10.3390/ani12070857>

- Kaiin, E. M., Gunawan, M., and Maulana, T. 2017. Morphometry and abnormality evaluation of sex-sorted sperm of spotted buffalo (Tedong bonga). *Nusantara Bioscience*, 9(2), 175-180. DOI : <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n090212>.
- Kaka, A., Memon, A. A., Khatri, P., Kumbhar, H. K., Kalhoro, D. H., Tariq, M., ... and Tunio, A. N. 2016. Determination of Quality Characteristics of Kundhi Buffalo Bull Semen. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 12, 394-397. DOI : <https://doi.org/10.6000/1927-5129.2016.12.61>
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Karthikeya, G., Rengarajan, K., and Kadirvel, G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system—a review. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 165-172. DOI : <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x>
- Kumar, P., Saini, M., Kumar, D., Balhara, A. K., Yadav, S. P., Singh, P., and Yadav, P. S. 2015. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal reproduction science*, 159, 38-45. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010>
- Kumar, P., Pawaria, S., Dalal, J., Ravesh, S., Bharadwaj, S., Jerome, A., ... and Yadav, P. S. 2019. Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo. *Animal reproduction science*, 209, 106166. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106166>
- Kumaresan, A., Johannisson, A., Al-Essawe, E. M., and Morrell, J. M. 2017. Sperm viability, reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above-and below-average fertility bulls. *Journal of dairy science*, 100(7), 5824-5836. DOI : <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12484>
- Kusumaningrum, D. A., dan Sianturi, R. G. 2017. Pengaruh media pengencer dan plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku Kerbau (*Bubalus bubalis*). In *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Agribisnis Peternakan (STAP)* (Vol. 5, pp. 368-374). <https://jnp.fapet.unsoed.ac.id/index.php/psv/article/view/92>.
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., and Parks, J. E. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal reproduction science*, 172, 1-9. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>
- Leahy, T., and Gadella, B. M. 2015. New insights into the regulation of cholesterol efflux from the sperm membrane. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 561-567. DOI : <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153309>
- Longobardi, V., Salzano, A., Campanile, G., Marrone, R., Palumbo, F., Vitiello, M., ... and Gasparrini, B. 2017. Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 88, 236-243. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.031>
- Maleki, K., Ayen, E., Khaki, A., and Soleimanzadeh, A. 2023. Comparison of sperm characteristics and antioxidant and oxidant levels in bull semen frozen with four widely used extenders. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 14, No. 7, p. 373). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. DOI : <https://doi.org/10.30466/vrf.2023.562594.3631>
- Miraz, M. F. H., Deb, G. K., Hossain, S. J., and Akter, S. 2022. Motion characteristics and plasma integrity evaluation of Murrah buffalo semen. *Asian-Australasian*

- Journal of Bioscience and Biotechnology, 7(2), 75-81. DOI : <https://doi.org/10.3329/aaajbb.v7i2.61097>
- Mittal, P. K., Madan, A. K., Sharma, V., Gottam, G. S., and Gupta, B. 2019. Cryopreservation of buffalo bull semen-restriction and expectation: A review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(1), 1351-1368. DOI : <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.801.144>
- Murphy, E. M., Murphy, C., O'Meara, C., Dunne, G., Eivers, B., Lonergan, P., and Fair, S. 2017. A comparison of semen diluents on the in vitro and in vivo fertility of liquid bull semen. Journal of dairy science, 100(2), 1541-1554. DOI : <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11646>
- Nain, D., Mohanty, T. K., Dewry, R. K., Bhakat, M., Nath, S., Gupta, V. K., and Parray, M. A. 2023. Butylated hydroxytoluene (bht) improves the post-thaw semen quality in low-dose sperm cryopreservation in murrah buffalo bull. CryoLetters, 44(1), 57-65. DOI : <https://doi.org/10.54680/fr23110110612>
- Naz, S., Umair, M., & Iqbal, S. (2018). Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Andrologia, 50(8), e13063. DOI : <https://doi.org/10.1111/and.13063>
- Naz, S., Umair, M., and Iqbal, S. 2019. Ostrich egg yolk improves post thaw quality and in vivo fertility of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Theriogenology, 126, 140-144. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.12.018>
- Nikitkina, E., Musidray, A., Krutikova, A., Anipchenko, P., Plemyashov, K., and Shiryayev, G. 2020. Efficiency of tris-based extender steridyl for semen cryopreservation in stallions. Animals, 10(10), 1801. DOI : <https://doi.org/10.3390/ani10101801>
- Saaban, N., Arman, C., Yuliani, E., dan Maskur. 2019. Substitusi Kuning Telur dengan Lesitin Kedelai sebagai Pengencer Semen dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Kerbau Penyimpanan 5 C. Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis, 6(3), 367-374. DOI : <http://dx.doi.org/10.33772/jitro.v6i3.8173>
- Ohee, F. R., Wajo, M. J., dan Sambodo, P. 2024. Perbandingan Efisiensi Sinkronisasi Birahi dengan Metode Intra Muskuler dan Intra Uteri Menggunakan PGF2 α pada Sapi Potong. Jurnal Peternakan, 21(September), 115–122. <https://ejournal.uin-suska.ac.id/index.php/peternakan/article/view/18274>.
- Raafi, M., Yusuf, M., Toleng, A. L., and Diansyah, A. M. 2021. Movement patterns of sperms at different bull breeds using computer-assisted sperm analysis (CASA). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 788, No. 1, p. 012137). June 2021. IOP Publishing. DOI : <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012137>
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N., and Kumar, N. 2018. A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. J. Entomol. Zool. Stud, 6(3), 239-245. <https://www.entomoljournal.com/archives/?year=2018&vol=6&issue=3&ArticleId=3575>.
- Ramazani, N., Mahd Gharebagh, F., Soleimanzadeh, A., Arslan, H. O., Keles, E., Gradinarska-Yanakieva, D. G., ... & Dinç, D. A. 2023. The influence of L-proline and fulvic acid on oxidative stress and semen quality of buffalo bull semen

- following cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science*, 9(4), 1791-1802. DOI : <https://doi.org/10.1002/vms3.1158>
- Rosnizar, R., Nurfajri, N., Dasrul, D., Amalia, A., dan Eriani, K. 2021. Evaluasi Kualitas Spermatozoa Pada Beberapa Frekuensi Ejakulasi Terhadap Kerbau Lokal (*Bubalus bubalis*). *Jurnal Bioleuser*, 5(1). DOI : <https://doi.org/10.24815/bioleuser.v5i1.22975>
- Ros-Santaella, J. L., and Pintus, E. 2021. Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. *Antioxidants*, 10(5), 772. DOI : <https://doi.org/10.3390/antiox10050772>
- Rusdiana, S., Talib, C., dan Anggraeni, A. 2020. Dukungan dan Penguatan Peternak Dalam Usaha Ternak Kerbau di Provinsi Banten. *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, 37(2), 95–114. <https://epublikasi.pertanian.go.id/berkala/fae/article/view/1117>.
- Setiawan, B. D. 2022. Identifikasi Kerbau (*Bubalus bubalis*) Yang Dipelihara di Kecamatan Talang Empat. *Jurnal Ilmu Pertanian Kelingi*, 2(1), 158–165. DOI : <https://doi.org/10.58328/jipk.v2i1.66>
- Singh, M., Rajoriya, J. S., Kumar, A., Ghosh, S. K., and Prasad, J. K. 2018. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen: Current status and future prospective. *Buffalo Bulletin*, 37(2), 109-128. <https://kuojs.lib.ku.ac.th/index.php/BufBu/article/view/42>.
- Singh, R. K., Kumaresan, A., Mir, M. A., Kumar, P., Chhillar, S., Tripathi, U. K., ... and Mohanty, T. K. 2017. Computer assisted sperm analysis: Relationship between the movement characteristics of buffalo spermatozoa and sire fertility. *Indian Journal of Animal Research*, 51(4), 660-664. DOI : <http://10.0.73.117/ijar.10768>
- Singh, A. K., Kumar, A., Honparkhe, M., Kaur, S., Kaur, H., Ghuman, S. P. S., and Brar, P. S. 2018. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing ipotential of buffalo bull semen frozen in egg yolk-, soyabean lecithin-and liposome-based extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(1), 195-202. DOI : <https://doi.org/10.1111/rda.13092>
- Sohail, A., Andrabi, S. M. H., Anwar, M., Ali, L., and Mehmood, A. 2013. Assessment of buffalo bull semen quality based on sperm motility parameters, motion characteristics and in vitro fertilization rate. *Pak Vet J*, 33(1), 53-56. <https://agris.fao.org/search/en/providers/122650/records/64738d513ed73003714b1f4a>.
- Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., and Zhang, D. 2020. Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92, 146-150. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.004>
- Suzuki, K., Geshi, M., Yamauchi, N., and Nagai, T. 2003. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. *Animal reproduction science*, 77(3-4), 157-172. DOI : [http://dx.doi.org/10.1016%2FS0378-4320\(03\)00035-6](http://dx.doi.org/10.1016%2FS0378-4320(03)00035-6)
- Üstüner, B., Alçay, S., Nur, Z., Sağırkaya, H., and MK, S. 2014. Effect of egg yolk and soybean lecithin on tris-based extender in post-thaw ram semen quality and in vitro fertility. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3). 393-398. DOI: <https://doi.org/10.9775/kvfd.2013.10248>.
- Venkatesh, S., Murugavel, K., Hemalatha, H., Kantharaj, S., and Shalini, G. 2024. PERSPECTVE: Semen additives for improving frozen-thawed buffalo and cattle

- semen-a review. *Cryoletters*, 45(4), 194-211. DOI : <https://doi.org/10.54680/fr24410110112>
- Vyklicka, L., and Lishko, P. V. 2020. Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. *Current opinion in cell biology*, 63, 154-161. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.01.015>
- Yendraliza, Y., Zespin, B. P., Udin, Z., Jaswandi, J., and Arman, C. 2012. Penampilan Reproduksi Kerbau Post Partum pada Berbagai Level GnRH yang disinkronisasi dengan PGF 2 α . *Jitv*, 17(2), 107–111.
- Yendraliza, Y., Yuliana, E., Rodiallah, M., and Zumarni, Z. 2019. Kualitas Semen Kerbau pada Waktu Ekuilibrasi dan Inkubasi yang Berbeda dalam Larutan Hipoosmotic Swelling TEST. *Jurnal Agripet*, 19(1), 22-30. DOI : <https://doi.org/10.17969/agripet.v19i1.13191>
- Yousef, M. S., López-Lorente, A. I., Diaz-Jimenez, M., Consuegra, C., Dorado, J., Pereira, B., ... and Hidalgo, M. 2020. Nano-depletion of acrosome-damaged donkey sperm by using lectin peanut agglutinin (PNA)-magnetic nanoparticles. *Theriogenology*, 151, 103-111. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.011>