



Pengaruh Air Tebu sebagai Kandidat Pengganti Fruktosa dalam Pengencer CEP terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi *Friesian Holstein* selama Penyimpanan Beku

The Effect of Sugarcane Water as a Candidate Substitute for Fructose in CEP Diluent on Spermatozoa Quality of Friesian Holstein Bull during Frozen Storage

Johana Dian Rahayu^{1*}, Nur Ducha¹

¹ Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences Surabaya State University. Jl. Ketintang, Ketintang, Gayungan, Surabaya City, 60231, East Java, Indonesia

* Corresponding Author. E-mail address: johana.18051@mhs.unesa.ac.id

ARTICLE HISTORY:

Submitted: 19 May 2022

Accepted: 25 June 2022

KATA KUNCI:

Air tebu
Fruktosa
Pengencer CEP
Penyimpanan beku
Spermatozoa Sapi *Friesian Holstein*

ABSTRAK

Air tebu mengandung sukrosa yang berfungsi sebagai sumber energi untuk meningkatkan ATP dan motilitas spermatozoa. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh air tebu sebagai kandidat pengganti fruktosa dalam pengencer *Cauda Epididymal Plasma* (CEP) terhadap kualitas spermatozoa sapi *Friesian Holstein* (FH) pada penyimpanan beku. Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian eksperimen dengan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) 5 perlakuan, yaitu A (CEP+0% air tebu); B (CEP tanpa fruktosa + 15% air tebu); C (CEP tanpa fruktosa + 20% air tebu); D (CEP tanpa fruktosa + 25% air tebu); E (CEP tanpa fruktosa + 30% air tebu) dengan masing-masing 4 pengulangan. Parameter yang digunakan adalah motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa sapi FH. Motilitas spermatozoa diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan menambahkan pewarna eosin-negrosin pada semen dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Uji integritas membran spermatozoa dilakukan dengan metode HOST lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Analisis data menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, lalu uji ANOVA satu arah dan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan D (CEP tanpa fruktosa+25% air tebu) dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sebesar $36,49 \pm 0,28\%$; viabilitas sebesar $45,39 \pm 0,33\%$ dan integritas membran sebesar $43,91 \pm 0,21\%$ pasca *thawing*. Simpulan dari penelitian ini adalah air tebu memiliki pengaruh untuk mempertahankan kualitas spermatozoa sapi FH pada penyimpanan beku dengan konsentrasi terbaik sebesar 25%.

ABSTRACT

Sugarcane water contains sucrose which function as an energy source to increase ATP and motility of spermatozoa. The purpose of this study was to determine the effect of sugarcane water as a candidate for fructose substitute in *Cauda Epididymal Plasma* (CEP) diluent on the sperm quality of *Friesian Holstein* (FH) bull in frozen storage. This type of research was experimental research with Completely Randomized Design (CRD) with 5 treatments, namely A

KEYWORDS:

CEP Diluent
Friesian Holstein Bull Spermatozoa
Frozen storage
Fructose
Sugarcane water

© 2022 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/>

(CEP+0% sugarcane water); B (CEP without fructose + 15% sugarcane water); C (CEP without fructose + 20% sugarcane water); D (CEP without fructose + 25% sugarcane water); E (CEP without fructose + 30% sugarcane water) with 4 repetitions each. Parameters used were motility, viability, and membrane integrity of FH bull spermatozoa. Spermatozoa motility was observed under a microscope with a magnification of 400x. Spermatozoa viability was carried out by adding eosin-negrosin dye to semen and observed under a microscope with a 400x magnification. Spermatozoa membrane integrity was carried out using HOST method and then observed under a microscope with a magnification of 400x. Data analysis used the Kolmogorov-Smirnov, then the One-Way ANOVA and Duncan tests. The results showed that treatment D(CEP without fructose + 25% sugarcane water) was able to maintain the motility of spermatozoa by $36,49 \pm 0,28\%$; the viability was $45,39 \pm 0,33\%$; and membrane integrity was $43,91 \pm 0,21\%$ after thawing. The conclusion of this research was sugarcane water had an effect on maintaining the quality of the spermatozoa of FH bull in frozen storage with the best concentration of 25%.

1. Pendahuluan

Konsumsi susu nasional diperkirakan akan terus meningkat secara positif seiring dengan pertambahan jumlah penduduk dengan asumsi laju pertumbuhan penduduk sebesar 1,15% per tahun (Nugroho *et al.*, 2019). Menurut data Badan Pusat Statistika Nasional (2019), jumlah susu yang dikonsumsi masyarakat di Indonesia pada tahun 2019 masih sekitar 16,23 kg/orang/tahun. Jika kebutuhan susu nasional sebesar 4,3 juta ton, maka produksi susu segar di Indonesia hanya dapat memenuhi sekitar 22% dari kebutuhan nasional. Peningkatan produksi susu nasional tidak hanya berdampak pada perbaikan gizi masyarakat, tetapi juga berdampak terhadap peningkatan kesejahteraan peternak. Oleh karena itu, peluang peningkatan produksi susu tetap terbuka bagi peternak sapi perah.

Salah satu sapi perah yang banyak dikembangkan di Indonesia adalah sapi Fresian Holstein (FH). Dibandingkan dengan sapi perah lainnya, sapi ini merupakan sapi penghasil susu tertinggi yang memiliki kandungan lemak relatif rendah (Riski *et al.*, 2016). Menurut Makin (2012), salah satu faktor yang terkait dalam peningkatan produksi susu sapi adalah perbaikan mutu genetik ternak. Holden dan Butler (2018) menambahkan bahwa peningkatan populasi dan mutu genetik ternak dapat dilakukan dengan cara melakukan seleksi terhadap indukan jantan dan betina yang unggul dan sehat. Dengan menerapkan teknologi Inseminasi Buatan (IB) peternak dapat memperbaiki mutu genetik serta meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak (Zuidema *et al.*, 2021). Menurut Noakes

et al. (2018) IB merupakan salah satu cara untuk mengatasi keterbatasan jumlah pejantan unggul agar kapasitas reproduksinya dapat digunakan secara maksimal. Mulu dkk, (2018), menambahkan bahwa teknologi IB dapat meningkatkan kapasitas pemuliaan pejantan dengan mengurangi adanya resiko penularan penyakit dari kelamin pada hewan ternak.

Faktor keberhasilan dari teknologi IB sangat dipengaruhi oleh tingkat fertilitas spermatozoa yang disimpan (Mohan *et al.*, 2018). Menurut Fitriyah *et al.* (2019) metode penyimpanan semen dapat mempertahankan fertilitas spermatozoa serta menghambat metabolisme secara fisik maupun kimiawi. Menurut Ducha (2016), teknik penyimpanan spermatozoa dibagi menjadi dua yakni penyimpanan cair dan beku. Penyimpanan semen yang dilakukan pada suhu rendah yaitu 4°C sampai 5°C disebut sebagai penyimpanan cair, sedangkan penyimpanan dalam nitrogen cair dengan suhu -196°C disebut penyimpanan beku. Menurut Raspa *et al.* (2018), penyimpanan beku mampu mempertahankan kualitas spermatozoa hingga bertahun tahun, karena pada prinsipnya metabolisme spermatozoa akan dihentikan dengan cara dibekukan.

Menurut Bustani dan Baiee (2021), pada proses penyimpanan suhu rendah spermatozoa akan rentan terhadap kerusakan baik secara struktural maupun fungsional. Ducha *et al.* (2013) menyatakan, bahwa kerusakan dapat terjadi akibat adanya *cold shock* yang menyebabkan susunan lipid membran mengalami perubahan. Ribeiro *et al.* (2022) menambahkan, bahwa proses pembekuan dapat merusak spermatozoa karena terbentuknya kristal es dalam sel akibat proses pengeluaran air secara intraseluler yang dapat menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Oleh sebab itu, untuk memperkecil kemungkinan kerusakan struktur sel spermatozoa saat penyimpanan, maka perlu ditambahkan suatu media yang disebut pengencer. Menurut Ducha (2012), bahan pengencer yang telah dikembangkan untuk menyimpan spermatozoa pada suhu rendah bertujuan untuk menjaga kualitas spermatozoa serta meningkatkan volume semen. Yohana *et al.* (2014) menambahkan bahwa ada berbagai jenis pengencer, yaitu pengencer organik, sintetis dan gabungan. Pengencer organik seperti air susu, santan dan air kelapa sedangkan pengencer sintetis terdiri dari bahan kimia seperti natrium sitrat, tris aminomethan, NaCl, dan lain lain. Salah satu pengencer yang dapat digunakan untuk menyimpan semen sapi adalah *Cauda Epididymal Plasma* (CEP).

Pengencer CEP merupakan salah satu jenis pengencer yang dikembangkan berdasarkan kondisi fisik dan kimia epididimis sapi, yang diharapkan mampu memberikan kondisi lingkungan yang cocok untuk spermatozoa selama proses penyimpanan suhu rendah (Nugroho *et al.*, 2014). Pengencer ini awalnya dikembangkan oleh Verberckmoes *et al.*, (2004) dan dimodifikasi lebih lanjut oleh Ducha (2012) dengan metode pembuatan, jenis antibiotik dan konsentrasi kuning telur (Ducha *et al.*, 2018). Pengencer CEP terbuat dari larutan aliquot NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, NaHCO_3 , NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Fruktosa, Sorbitol, Tris, Penisilin, Streptomisin, Asam sitrat dan BSA yang selanjutnya disuplementasi dengan kuning telur sebanyak 20% (Ducha., 2018). Tujuan ditambahkannya kuning telur dalam pengencer ini adalah untuk melindungi membran spermatozoa dari *cold shock* (Ducha *et al.*, 2013).

Menurut Kameni *et al.* (2021) untuk menjaga kualitas spermatozoa, pengencer harus memiliki kandungan sumber energi dan nutrisi yang cukup, memiliki penyangga untuk menyetabilkan pH, bahan krioprotektan untuk mencegah kerusakan membran spermatozoa, zat anti mikrobial, bersifat antioksidan, tidak toksik, dan isotonis. Inonie *et al.* (2016) menambahkan syarat penting pengencer yang baik yaitu murah, sederhana, praktis, memiliki daya preservasi yang tinggi dan mengandung unsur sifat fisik maupun kimia yang sama dengan semen. Jika semen diencerkan, perlu ditambahkan bahan berupa glukosa dan fruktosa dalam pengencer yang bertujuan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Glukosa dan fruktosa merupakan salah satu bahan sintesis yang harganya relatif mahal. Untuk itu diperlukan bahan alternatif yang lebih murah, mudah didapat, memenuhi syarat sebagai pengencer dan tidak mengandung zat toksik bagi spermatozoa (Duma *et al.*, 2021). Salah satu bahan organik alternatif yang mudah didapat serta terjangkau adalah air tebu.

Air tebu mengandung pati yang tersusun atas sukrosa yang terdiri dari glukosa dan fruktosa (Ninchan dan Noidee, 2021). Erwinda *et al.* (2014) menyebutkan ekstrak air tebu murni mengandung 18,08% sukrosa dan 0,54% gula invert, dimana kandungan komponen tersebut lebih tinggi daripada komponen lainnya didalam air tebu. Menurut Amaral *et al.* (2013), sukrosa dapat berfungsi sebagai substrat sumber energi yang sangat penting untuk meningkatkan konsentrasi ATP dan motilitas spermatozoa. Berdasarkan Riyadhi (2020), pengencer air tebu yang dikombinasikan dengan kuning telur dapat mempertahankan motilitas spermatozoa hingga dua hari. Anwar *et al.* (2014)

menambahkan bahwa ekstrak air tebu yang ditambahkan ke dalam kuning telur dapat digunakan sebagai pengencer pada semen sapi dan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa hingga hari ke-6 dengan motilitas di atas 40%. Pada penelitian Arsyad *et al.* (2021), penambahan 20% air tebu pada pengencer ringer laktat kuning telur dapat mempertahankan motilitas progresif sebesar 77,67% spermatozoa ayam hutan merah selama penyimpanan 24 jam. Namun demikian, sejauh ini belum ada studi mengenai pengaruh penambahan air tebu dalam pengencer CEP pada penyimpanan beku. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan air tebu dalam pengencer CEP sebagai kandidat pengganti fruktosa dalam upaya mempertahankan kualitas spermatozoa sapi FH pada penyimpanan beku.

2. Materi dan Metode

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan desain Rangkaian Acak Lengkap. Terdapat 5 perlakuan dengan 4 pengulangan, yaitu A (CEP+0% air tebu); B (CEP tanpa fruktosa + 15% air tebu); C (CEP tanpa fruktosa + 20% air tebu); D (CEP tanpa fruktosa + 25% air tebu); E (CEP tanpa fruktosa + 30% air tebu).

2.1. Materi

Alat penelitian yaitu sendok bahan kimia, timbangan digital, aluminium foil, kertas saring, kertas label, tisu, *erlenmeyer* merk Pirex dan Iwaki 100 mL, spuit merk One med ukuran 1 mL, 5 mL dan 10 mL, gelas *beaker* merk Iwaki ukuran 1000 mL, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi dan *membrane miliphore* merk Sartorius ukuran 0,22 μ m, *Artificial Vagina* (AV). Bahan penelitian yaitu NaCl, KCl Sigma, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ Sigma, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ Bio Basic Canada, NaHCO_3 Sigma, NaH_2PO_4 Sigma, KH_2PO_4 Sigma, Fruktosa Bio World, Sorbitol Sigma, Tris-base Bio World, *Citric acid* Sigma, Streptomycin Meiji, Penicilin Meiji, BSA, Steril deionized water Otsuka, gliserol 10% dan kuning telur ayam strain *hisex brown*, semen segar dikoleksi dari 4 ekor pejantan sapi *Fresian Holstein* (FH).

2.2. Metode

2.2.1. Pembuatan Pengencer CEP

Alat yang digunakan dalam pembuatan pengencer CEP adalah sendok bahan kimia, timbangan digital, aluminium foil, kertas saring, kertas label, tisu, *erlenmeyer* merk Pirex

dan Iwaki 100 mL, spuit merk One med ukuran 1 mL, 5 mL dan 10 mL, gelas *beaker* merk Iwaki ukuran 1000 mL, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, rak tabung reaksi dan *membrane miliphore* merk Sartorius ukuran 0,22 μm .

Bahan pengencer CEP berdasarkan Ducha (2018) yaitu NaCl, KCl Sigma, $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ Sigma, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ Bio Basic Canada, NaHCO_3 Sigma, NaH_2PO_4 Sigma, KH_2PO_4 Sigma, Fruktosa Bio World, Sorbitol Sigma, Tris-base Bio World, *Citric acid* Sigma, Streptomycin Meiji, Penicilin Meiji, BSA, Steril deonized water Otsuka, gliserol 10% dan kuning telur ayam strain *hisex brown*. Semua bahan dihomogenkan secara *aliquot* dengan *steril water* dan disterilisasi dengan membran *miliphore* berukuran 0,22 μm . Larutan CEP yang telah steril disuplementasi dengan kuning telur sebanyak 20% lalu didiamkan 3 hari dalam *refrigerator* sampai terbentuk dua lapisan yaitu supernatan dan endapan. Lapisan supernatan tersebut diambil menggunakan spuit dan digunakan sebagai pengencer CEP. Penambahan air tebu menggunakan tebu segar yang berumur ± 11 bulan dan digiling untuk mendapatkan air tebu. Air tebu disaring dengan kertas saring lalu disterilisasi dengan membran *miliphore* saat pengencer akan digunakan.

2.3. Koleksi Semen segar

Semen segar dikoleksi dari 4 ekor pejantan sapi *Fresian Holstein* (FH) yang ditampung dengan metode *Artificial Vagina* (AV). Semen segar diperiksa secara makroskopis meliputi volume, warna, pH, bau, konsistensi dan konsentrasi. Evaluasi mikroskopis yaitu motilitas massa dan motilitas individu. Evaluasi makroskopis dilakukan dengan pengamatan secara langsung pada semen segar, sedangkan evaluasi mikroskopis dilakukan dengan melakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

2.4. Proses Pengenceran dan Pembekuan

Berdasarkan Kalsum (2021) proses pengenceran dilakukan dalam 3 tahap yaitu pengenceran A1, A2, dan B. Pengencer A1 dan A2 dilakukan pada suhu 37°C dan pengencer B dilakukan dalam *cool tube* dengan suhu 5°C. Pengenceran A1 yaitu volume total semen yang didapat ditambahkan dengan larutan pengencer sesuai perlakuan dengan volume perbandingan 1:1. Selanjutnya dilakukan pengenceran A2 pada suhu 37°C dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Vol. A2} = \frac{V_{\text{total}}}{2} - \sum \text{Vol. semen} + \text{Vol. A1}$$

Keterangan :

Vol. A1 = volume pengenceran A1 (mL)

Vol. A2 = volume pengenceran A2 (mL)

V total = volume total pengenceran (mL)

Vol. Semen = volume semen segar (mL)

Sebelum menghitung nilai volume pengenceran A2, terlebih dahulu dihitung nilai volume total pengencer, dengan rumus volume total sebagai berikut :

$$V. \text{ Total} = \frac{\text{Vol. Semen} \times \text{Konsentrasi spermatozoa} \times 0,25}{25 \times 10^6}$$

Keterangan :

Vol. B = volume pengenceran B (mL)

V total = volume total pengenceran (mL)

Vol. Semen = volume semen segar (mL)

Setelah tahap A2, semen yang telah diencerkan kemudian disimpan kedalam *cool tube* hingga suhu turun menjadi 5°C. Selanjutnya dilakukan pengenceran B yaitu pengencer CEP yang telah disuplementasi kuning telur 20% dan gliserol 10%. Perhitungan pengencer B dilakukan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Vol. B} = \frac{V_{\text{Total}}}{2}$$

Setelah pengenceran, selanjutnya proses pembekuan semen dimulai dengan menurunkan suhu 3-5°C didalam *cool tube* dan setelahnya dilakukan proses *Filling-sealing*. Tahap selanjutnya merupakan tahap *pre-freezing* yaitu *straw* diletakkan diatas uap N₂ cair dalam goblet dengan jarak ± 2cm selama 12 menit dengan suhu -140°C. Selanjutnya dilakukan proses *freezing* yaitu pembekuan dengan suhu -196°C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan proses pengamatan kualitas semen *after freezing*.

Proses pengamatan dilakukan secara 2 tahap yaitu pengamatan kualitas semen *before freezing* setelah dilakukan pengenceran B yang merupakan syarat semen tersebut layak untuk dilanjutkan ke proses pembekuan dan pengamatan *after freezing* yaitu semen

yang telah dibekukan selama 24 jam lalu di *thawing* dalam air hangat dengan suhu 37°C selama 5-10 detik.

2.5. Pengamatan Motilitas

Uji motilitas spermatozoa berdasarkan metode Garner dan Hafez (2008) dengan menghitung persentase motilitas spermatozoa yang bergerak maju dan progresif yang dinilai oleh 2 individu kemudian diambil rata-ratanya. Menurut Engidawork, (2018), pengamatan motilitas dilakukan dengan meneteskan semen ke kaca objek dan menutupnya dengan kaca penutup lalu diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

2.6. Pengamatan Viabilitas

Berdasarkan Mahiddine *et al.* (2020) uji viabilitas spermatozoa dilakukan dengan cara semen diteteskan pada ujung kaca objek dan menambahkan pewarna eosin negrosin lalu dicampur hingga rata. Setelah tercampur, kaca objek lain ditempelkan dengan sudut kemiringan 45° terhadap kaca objek semen kemudian diratakan hingga menjadi preparat tipis. Selanjutnya preparat dikering-anginkan dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Menurut Kumaresan *et al.* (2017) persentase viabilitas diperoleh dari perhitungan spermatozoa hidup per jumlah keseluruhan spermatozoa dan dikali 100%. Sitepu *et al.* (2018) menambahkan bahwa sel spermatozoa yang dapat menyerap warna merupakan spermatozoa yang telah mati sedangkan sel yang tidak menyerap warna merupakan spermatozoa yang masih hidup.

2.7. Pengamatan Integritas Membran

Menurut Agarwal *et al.* (2016), uji integritas membran spermatozoa dilakukan dengan metode HOST (*Hypo Osmotic Swelling Test*). Larutan HOST merupakan larutan yang dibuat dengan mencampurkan natrium sitrat dan fruktosa ke dalam aquades. Semen diteteskan pada ujung kaca objek lalu ditambahkan larutan HOST dan dicampur hingga rata. Setelah homogen, kaca objek lain ditempelkan dengan sudut kemiringan 45° terhadap kaca objek semen dan diratakan hingga menjadi preparat tipis lalu dikering-anginkan. Preparat tersebut kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Berdasarkan Mahiddine *et al.* (2020), persentase perhitungan integritas membran

diperoleh dari jumlah sel spermatozoa yang memiliki membran utuh per jumlah keseluruhan sel spermatozoa yang diamati dikali 100%. Swelum *et al.* (2018) menambahkan bahwa membran utuh ditunjukkan dengan ekor sel spermatozoa yang menggulung, sedangkan sel yang tidak utuh ditunjukkan dengan ekor sel spermatozoa lurus.

2.8. Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya diubah dalam bentuk *arcsin* untuk dianalisis uji normalitas menggunakan uji *Kolmogorof-Smirnov*. Data kemudian dianalisis dengan uji ANOVA satu arah dan uji Duncan menggunakan program statistik SPSS 23.0.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Hasil

Hasil evaluasi dari semen segar yang digunakan untuk penelitian ini meliputi volume 1 mL; warna putih susu; konsistensi kental; pH 6,8; motilitas massa 3+ dan motilitas individu sebesar 90%. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh nilai rata-rata persentase motilitas \pm standar deviasi (SD), viabilitas \pm SD, dan integritas membran \pm SD spermatozoa Sapi FH pada 5 perlakuan selama penyimpanan beku (-196°C).

3.1.1. Motilitas spermatozoa

Motilitas spermatozoa merupakan parameter yang sangat penting untuk mengevaluasi tingkat fertilitas spermatozoa (Yaghoobi *et al.*, 2022). Nilai rata-rata persentase motilitas berdasarkan hasil uji *Duncan* ($\alpha=0,05$) menunjukkan adanya perbedaan nyata pada setiap perlakuan (**Tabel 1**)

Rerata motilitas tertinggi *before freezing* diperoleh pada pengencer CEP+0% air tebu dengan nilai sebesar 58,05%, sedangkan rerata terendah terdapat pada perlakuan pengencer CEP+15% air tebu yaitu 52,61%. Nilai rata-rata motilitas tertinggi *after freezing* diperoleh pada perlakuan pengencer CEP+0% air tebu yaitu sebesar 40,11% dan rata-rata terendah terdapat pada perlakuan pengencer CEP+15% air tebu yaitu 27,18%.

Tabel 1. Hasil rata-rata persentase motilitas \pm standar deviasi (SD) spermatozoa sapi FH dalam pengencer CEP dengan penambahan berbagai konsentrasi air tebu.

Perlakuan	Rata-rata Motilitas (%) \pm SD	
	<i>Before Freezing</i>	<i>After Freezing</i>
CEP+0% air tebu	58,05 \pm 0,26 ^e	40,11 \pm 0,41 ^e
CEP+15% air tebu	52,61 \pm 0,28 ^a	27,18 \pm 0,33 ^a
CEP+20% air tebu	53,73 \pm 0,35 ^b	30,08 \pm 0,16 ^b
CEP+25% air tebu	55,62 \pm 0,30 ^d	36,49 \pm 0,28 ^d
CEP+30% air tebu	54,55 \pm 0,38 ^c	33,47 \pm 0,25 ^c

Keterangan: notasi (^{a,b,c,d,e}) yang berbeda pada satu kolom yang sama mengindikasikan adanya perbedaan nyata dari setiap perlakuan.

3.1.2. Viabilitas spermatozoa

Viabilitas spermatozoa merupakan suatu parameter untuk menentukan kualitas spermatozoa menggunakan zat pewarna eosin-negrosin (Mahiddine *et al.*, 2020). Spermatozoa yang hidup akan lebih sedikit menyerap warna eosin yaitu sebanyak 0-2%, sedangkan spermatozoa yang mati akan menyerap pewarna eosin lebih banyak karena permeabilitas membran meningkat dikarenakan sel yang mati (Malinda *et al.*, 2021). Pengamatan viabilitas spermatozoa bertujuan untuk mengetahui kualitas tingkat hidup spermatozoa (Kumaresan *et al.*, 2017). Nilai rata-rata persentase viabilitas spermatozoa berdasarkan hasil uji *Duncan* ($\alpha=0,05$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada setiap perlakuan (**Tabel 2**).

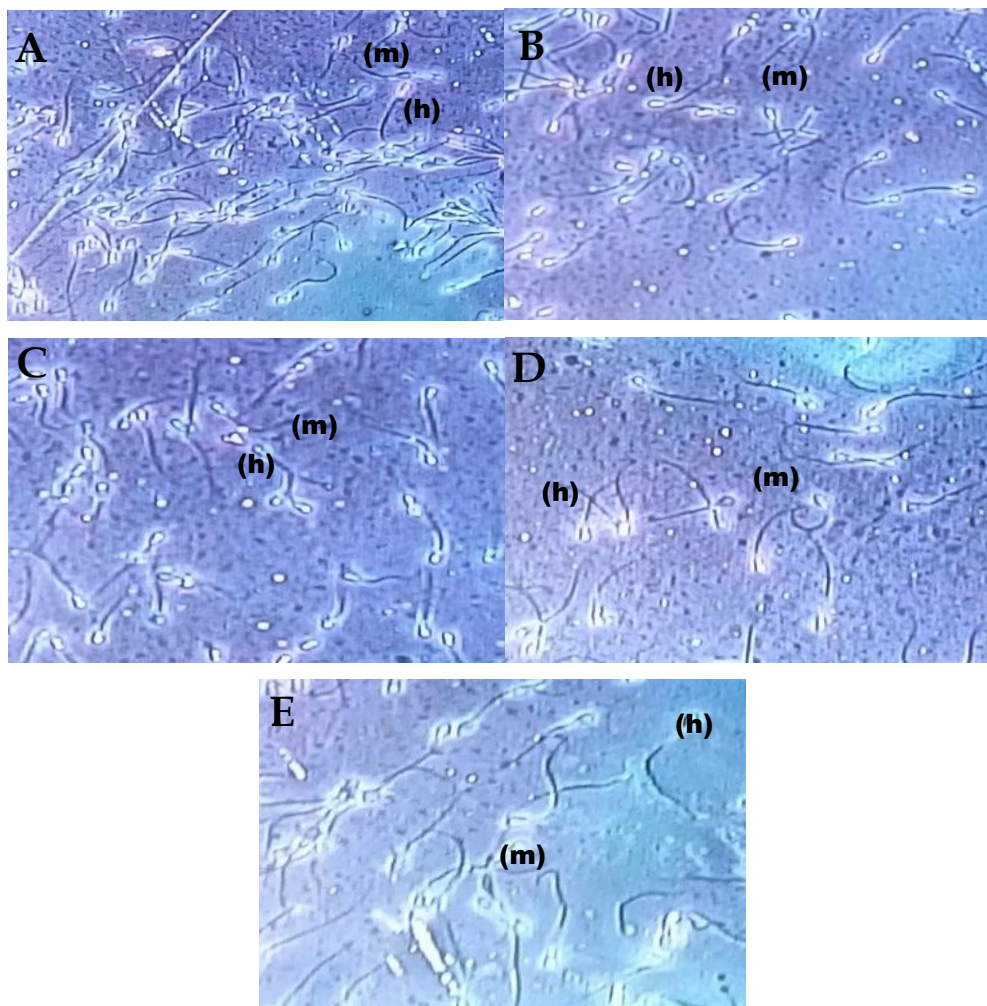
Tabel 2. Hasil rata-rata persentase viabilitas \pm standar deviasi (SD) spermatozoa sapi FH dalam pengencer CEP dengan penambahan berbagai konsentrasi air tebu.

Perlakuan	Rata-rata Viabilitas (%) \pm SD	
	<i>Before Freezing</i>	<i>After Freezing</i>
CEP+0% air tebu	66,13 \pm 0,41 ^e	46,71 \pm 0,15 ^e
CEP+15% air tebu	55,09 \pm 0,34 ^a	37,98 \pm 0,29 ^a
CEP+20% air tebu	57,18 \pm 0,29 ^b	41,08 \pm 0,25 ^b
CEP+25% air tebu	62,56 \pm 0,27 ^d	45,39 \pm 0,33 ^d
CEP+30% air tebu	59,47 \pm 0,30 ^c	43,69 \pm 0,26 ^c

Keterangan: notasi (^{a,b,c,d,e}) yang berbeda pada satu kolom yang sama mengindikasikan adanya perbedaan nyata dari setiap perlakuan.

Rerata viabilitas tertinggi *before freezing* diperoleh pada perlakuan pengencer CEP+0% air tebu dengan nilai sebesar 66,13% sedangkan rerata terendah diperoleh pada perlakuan dengan penambahan 15% air tebu yaitu 55,09%. Pada tahap *after freezing*, rerata viabilitas tertinggi juga diperoleh perlakuan 0% air tebu dengan nilai sebesar

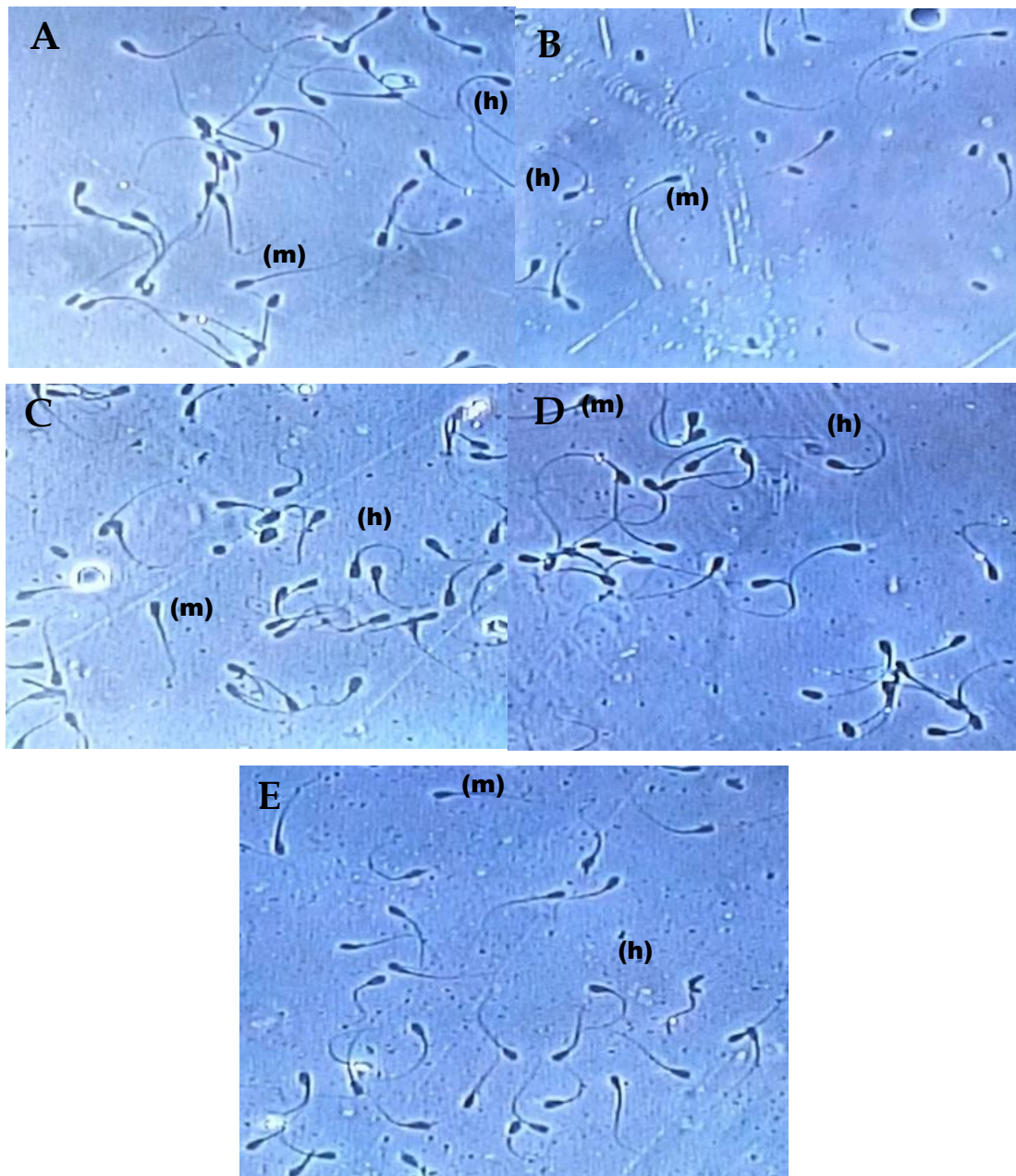
46,71%, sedangkan rerata paling rendah diperoleh pada perlakuan dengan penambahan 15% air tebu dengan nilai sebesar 37,98%.



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa setiap perlakuan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Keterangan: **A** (CEP+0% air tebu); **B** (CEP tanpa fruktosa+15% air tebu); **C** (CEP tanpa fruktosa+20% air tebu); **D** (CEP tanpa fruktosa+25% air tebu); **E** (CEP tanpa fruktosa+30% air tebu); **h**= sel spermatozoa hidup dan **m**= sel spermatozoa mati

3.1.3. Integritas membran spermatozoa

Integritas membran merupakan parameter kualitas yang dilihat dari keutuhan membran plasma sel spermatozoa yang dapat diuji menggunakan metode *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST) (Agarwal *et al.*, 2016). Swelum *et al.* (2018) menjelaskan bahwa sel spermatozoa yang memiliki membran utuh bagian ekornya akan menggulung dan menggelembung karena menyesuaikan dengan tekanan osmotik di sekitarnya.



Gambar 2. Integritas membran spermatozoa setiap perlakuan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Keterangan: **A** (CEP+0% air tebu); **B** (CEP tanpa fruktosa+15% air tebu); **C** (CEP tanpa fruktosa+20% air tebu); **D** (CEP tanpa fruktosa+25% air tebu); **E** (CEP tanpa fruktosa+30% air tebu); **h**= sel spermatozoa hidup dan **m**= sel spermatozoa mati

Nilai rata-rata persentase integritas membran spermatozoa berdasarkan hasil uji *Duncan* ($\alpha=0,05$) menunjukkan adanya perbedaan nyata pada setiap perlakuan (**Tabel 3**).

Tabel 3. Hasil rata-rata persentase integritas membran \pm standar deviasi (SD) spermatozoa sapi FH dalam pengencer CEP dengan penambahan berbagai konsentrasi air tebu.

Perlakuan	Rata-rata Integritas Membran (%) + SD	
	<i>Before Freezing</i>	<i>After Freezing</i>
CEP+0% air tebu	57,41 \pm 0,77 ^e	45,88 \pm 0,77 ^e
CEP+15% air tebu	48,30 \pm 0,62 ^a	39,32 \pm 0,48 ^a
CEP+20% air tebu	51,13 \pm 0,93 ^b	40,51 \pm 0,72 ^b
CEP+25% air tebu	54,55 \pm 0,34 ^d	43,91 \pm 0,21 ^d
CEP+30% air tebu	52,97 \pm 0,76 ^c	41,36 \pm 0,40 ^c

Keterangan: notasi (^{a,b,c,d,e}) yang berbeda pada satu kolom yang sama mengindikasikan adanya perbedaan nyata dari setiap perlakuan

Rerata integritas membran tertinggi pada tahap *before freezing* diperoleh pada perlakuan pengencer CEP+0% air tebu dengan nilai sebesar 57,41%, sedangkan rerata terendah diperoleh pada perlakuan dengan penambahan 15% air tebu yaitu sebesar 48,30%. Pada tahap *after freezing*, nilai rerata tertinggi juga diperoleh pada perlakuan 0% air tebu sebesar 45,88%, sedangkan rerata paling rendah diperoleh pada perlakuan dengan penambahan 15% air tebu dengan nilai sebesar 39,32%.

3.2. Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, air tebu yang disubstitusikan ke dalam pengencer CEP memiliki pengaruh terhadap kualitas spermatozoa sapi FH pada penyimpanan beku. Air tebu merupakan salah satu bahan alami alternatif yang dapat digunakan sebagai kandidat pengganti fruktosa pada pengencer CEP sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Pada penelitian ini kualitas spermatozoa dilihat dari beberapa parameter yaitu motilitas (daya gerak), viabilitas (daya hidup) dan integritas membran (keutuhan membran). Hasil uji *Duncan* ($\alpha=0,05$) pada rerata masing-masing kualitas spermatozoa menunjukkan adanya perbedaan nyata pada setiap perlakuan. Perlakuan 0% air tebu merupakan perlakuan kontrol yang memiliki nilai rata-rata persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran tertinggi pada tahap *before freezing* dan *after freezing* dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Perlakuan dengan penambahan 25% air tebu memiliki nilai rerata kualitas spermatozoa terbaik dibandingkan dengan perlakuan penambahan 15%, 20%, dan 30% air tebu dilihat dari tahap *before* maupun *after freezing*.

Berdasarkan data **Tabel 1** rata-rata persentase motilitas \pm standar deviasi (SD) spermatozoa sapi FH dalam pengencer CEP dengan penambahan berbagai konsentrasi air tebu menunjukkan perlakuan penambahan 0% air tebu merupakan perlakuan dengan hasil motilitas tertinggi yaitu sebesar $58,05 \pm 0,26\%$ pada *before freezing* dan $40,11 \pm 0,41\%$ pada *after freezing*. Tingginya nilai motilitas ini dapat dikarenakan pengencer CEP mengandung kadar fruktosa yang sesuai sebagai sumber energi bagi spermatozoa, sehingga nilai kualitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Keunggulan dari pengencer CEP lainnya yaitu memiliki komposisi ion serta osmolaritas yang sama dengan cairan plasma pada epididimis sapi sehingga mampu mempertahankan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas dan integritas membran (Ducha *et al.*, 2012; Indriani *et al.*, 2013; Purwoistri *et al.*, 2013).

Perlakuan dengan penambahan 15% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai motilitas terendah yaitu sebesar $52,61 \pm 0,28\%$ pada *before freezing* dan $27,18 \pm 0,33$ pada *after freezing*. Rendahnya nilai motilitas pada perlakuan ini terutama setelah pembekuan diduga karena kurangnya sumber energi didalam pengencer. Pada sel spermatozoa, suplai sumber energi merupakan hal terpenting untuk menunjang motilitas atau daya gerak spermatozoa yaitu berupa *Adenosine Triphosphat* (ATP) yang dihasilkan dari proses metabolisme. Kurangnya kandungan sukrosa air tebu pada perlakuan ini menyebabkan motilitas spermatozoa menurun dengan drastis. Pada perlakuan penambahan 20% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai motilitas sebesar $53,73 \pm 0,35\%$ pada *before freezing* dan $30,08 \pm 0,16\%$ pada *after freezing*. Nilai motilitas pada perlakuan ini lebih tinggi dibanding dengan perlakuan penambahan 15% air tebu. Yan *et al.* (2020) menambahkan bahwa motilitas atau daya gerak spermatozoa bergantung pada energi yang diberikan dalam bentuk ATP hasil metabolisme pada mitokondria.

Pada perlakuan penambahan 25% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai motilitas sebesar $55,62 \pm 0,30\%$ pada *before freezing* dan $36,49 \pm 0,28\%$ pada *after freezing*. Nilai motilitas pada perlakuan ini merupakan nilai yang paling tinggi diantara perlakuan penambahan air tebu lainnya. Hal ini diduga karena kandungan sukrosa pada air tebu dinilai cukup untuk menggantikan kadar fruktosa dalam pengencer CEP. Meskipun demikian, perlakuan penambahan 0% air tebu masih lebih baik dibandingkan dengan perlakuan penambahan 25% air tebu untuk mempertahankan

motilitas spermatozoa. Kemampuan perlakuan kontrol yang lebih baik ini diduga disebabkan oleh sifat stabilitas kimia pada pengencer CEP lebih baik dari pengencer perlakuan.

Perlakuan penambahan 30% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai motilitas sebesar $54,55 \pm 0,38\%$ pada *before freezing* dan $33,47 \pm 0,25\%$ pada *after freezing*. Nilai motilitas pada perlakuan ini lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 15% dan 20%, namun lebih rendah dari perlakuan 25%. Pada saat proses metabolisme, sukrosa akan menghasilkan lebih banyak asam laktat. Banamtuan *et al.* (2021) menambahkan bahwa konsentrasi asam laktat yang semakin menumpuk selama masa penyimpanan akan mengakibatkan pH pengencer turun dan akan menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Hal inilah yang menyebabkan motilitas spermatozoa pada perlakuan 30% ini menurun, dikarenakan kadar sukrosa pada pengencer terlalu tinggi sehingga menyebabkan nilai motilitas spermatozoanya menurun.

Motilitas spermatozoa adalah daya gerak spermatozoa dari satu tempat ke tempat lain. Berdasarkan Gliozzi (2017) motilitas spermatozoa merupakan salah satu cara sederhana, cepat dan murah yang digunakan sebagai parameter dasar untuk menentukan kualitas spermatozoa. Menurut Ducha (2018) standar baku kualitas semen yang digunakan untuk IB adalah dengan nilai motilitas sebesar $\geq 40\%$ setelah proses penyimpanan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan pengencer CEP dapat mempertahankan motilitas spermatozoa rata-rata dalam kisaran normal atau sesuai standar yang ditetapkan.

Berdasarkan data **Tabel 2** rata-rata persentase viabilitas \pm standar deviasi (SD) spermatozoa sapi FH dalam pengencer CEP dengan penambahan berbagai konsentrasi air tebu menunjukkan perlakuan 0% air tebu merupakan perlakuan dengan hasil viabilitas tertinggi yaitu sebesar $66,13 \pm 0,41\%$ pada *before freezing* dan $46,71 \pm 0,15\%$ pada *after freezing*. Hal ini disebabkan karena kandungan fruktosa dan bahan lainnya pada pengencer CEP diduga cukup dan sesuai untuk spermatozoa dalam mempertahankan hidup sehingga nilai viabilitasnya lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Menurut Mukminat dan Suharyati (2014) fruktosa merupakan gula monosakarida ($C_6H_{12}O_6$) yang akan lebih mudah diolah saat proses metabolisme untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa.

Pada perlakuan penambahan 15% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai viabilitas terendah yaitu sebesar $55,09 \pm 0,34\%$ pada *before freezing* dan $37,98 \pm 0,29\%$ pada *after freezing*. Rendahnya nilai viabilitas spermatozoa pada perlakuan ini disebabkan karena kurangnya sumber energi berupa karbohidrat pada pengencer. Semakin sedikit sumber energi yang terdapat pada pengencer akan menyebabkan turunnya daya hidup spermatozoa dikarenakan hanya ada sedikit energi yang bisa digunakan untuk metabolisme sel. Pada perlakuan penambahan 20% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai viabilitas sebesar $57,18 \pm 0,29\%$ pada *before freezing* dan $41,08 \pm 0,25\%$ pada *after freezing*. Nilai viabilitas pada perlakuan ini lebih tinggi dibandingkan perlakuan penambahan 15% air tebu. Pada perlakuan penambahan 25% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai viabilitas sebesar $62,56 \pm 0,27\%$ pada *before freezing* dan $45,39 \pm 0,33\%$ pada *after freezing*. Nilai viabilitas pada perlakuan ini merupakan nilai yang paling tinggi diantara perlakuan penambahan air tebu lainnya, namun masih lebih baik nilai viabilitas pada perlakuan 0% air tebu. Hal ini diduga karena sukrosa merupakan gula disakarida ($C_{12}H_{22}O_{11}$) yang harus disederhanakan dahulu menjadi fruktosa agar dapat digunakan sebagai sumber energi untuk mempertahankan viabilitas spermatozoa. Namun demikian, sukrosa akan memerlukan waktu yang lebih lama dan energi lebih banyak untuk dipecah menjadi fruktosa.

Perlakuan penambahan 30% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai viabilitas sebesar $59,47 \pm 0,30\%$ pada *before freezing* dan $43,69 \pm 0,26\%$ pada *after freezing*. Nilai viabilitas pada perlakuan ini lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 15% dan 20%, namun lebih rendah dari perlakuan 25%. Hal ini diduga karena tingginya asam laktat yang dihasilkan oleh sukrosa pada saat metabolisme yang menyebabkan pH pengencer menurun dan menyebabkan turunnya viabilitas spermatozoa.

Gambar 1 menunjukkan viabilitas spermatozoa setiap perlakuan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Spermatozoa yang hidup tidak dapat menyerap zat pewarna, namun spermatozoa yang mati dapat menyerap zat pewarna sehingga warnanya akan berubah menjadi merah (Mahiddine *et al.*, 2020). Menurut Riyadhi (2020), spermatozoa yang telah mati memiliki membran permeabilitas yang tinggi sehingga daya serap warnanya tinggi, namun pada spermatozoa yang masih hidup membran

permeabilitasnya cenderung rendah sehingga tidak dapat menyerap warna. Tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa turunya viabilitas spermatozoa sejalan dengan motilitas spermatozoa. Rochmi dan Sofyan (2019) menambahkan bahwa persentase viabilitas pada spermatozoa seharusnya lebih tinggi dari persentase motilitas spermatozoa. Hal ini dikarenakan ada kemungkinan spermatozoa yang dapat bertahan hidup meskipun tidak motil (bergerak).

Berdasarkan data **Tabel 3** rata-rata persentase integritas membran \pm standar deviasi (SD) spermatozoa sapi FH dalam pengencer CEP dengan penambahan berbagai konsentrasi air tebu menunjukkan perlakuan penambahan 0% air tebu merupakan perlakuan dengan hasil integritas membran tertinggi yaitu sebesar $57,41 \pm 0,77\%$ pada *before freezing* dan $45,88 \pm 0,77\%$ pada *after freezing*. Hal ini dapat terjadi karena pengencer CEP memiliki sifat stabilitas kimia yang lebih baik daripada pengencer perlakuan. Ducha (2012) menambahkan bahwa pengencer CEP mengandung sorbitol untuk meningkatkan osmolaritas serta fruktosa dan asam sitrat sebagai sumber energi sehingga dapat mengurangi resiko kerusakan membran pada spermatozoa.

Perlakuan dengan penambahan 15% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai integritas membran terendah yaitu sebesar $48,30 \pm 0,62\%$ pada *before freezing* dan $39,32 \pm 0,48\%$ pada *after freezing*. Hal ini dapat terjadi diduga karena kurangnya sumber energi berupa gula didalam pengencer. Herdis *et al.* (2016) menambahkan bahwa rendahnya integritas membran dapat menyebabkan metabolisme sel terganggu. Pada perlakuan penambahan 20% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai integritas membran sebesar $51,13 \pm 0,93\%$ pada *before freezing* dan $40,51 \pm 0,72\%$ pada *after freezing*. Nilai integritas membran pada perlakuan ini lebih tinggi dibanding dengan perlakuan penambahan 15% air tebu. Pada perlakuan penambahan 25% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai integritas membran sebesar $54,55 \pm 0,34\%$ pada *before freezing* dan $43,91 \pm 0,21\%$ pada *after freezing*. Nilai integritas membran pada perlakuan ini merupakan nilai yang paling tinggi diantara perlakuan penambahan air tebu lainnya, namun masih lebih baik nilai integritas membran pada perlakuan penambahan 0% air tebu. Menurut Anwar *et al.* (2014) sukrosa merupakan kelompok disakarida yang dapat disederhanakan oleh spermatozoa menjadi dua unit monosakarida yaitu glukosa dan fruktosa yang terlibat dalam dua siklus metabolisme yaitu siklus krebs dan glikolisis sehingga dapat membantu

memecah ikatan dua unit monosakarida menjadi *Adenosine Triphosphate* (ATP) dan *Adenosine Diphosphate* (ADP) yang dimanfaatkan spermatozoa untuk melakukan bergerak dan bertahan hidup.

Perlakuan penambahan 30% air tebu ke dalam pengencer CEP tanpa fruktosa memiliki nilai integritas membran sebesar $52,97 \pm 0,76\%$ pada *before freezing* dan $41,36 \pm 0,40\%$ pada *after freezing*. Nilai integritas membran pada perlakuan ini lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan 15% dan 20%, namun lebih rendah dari perlakuan 25%. Hal ini diduga karena semakin tinggi kadar sukrosa maka asam laktat yang dihasilkan juga akan meningkat. Mukminat dan Suharyati (2014) menyatakan bahwa penumpukan asam laktat yang terlalu tinggi akan membuat pH menjadi terlalu asam bagi spermatozoa. Suasana pengencer yang terlalu asam akan menjadi toksik bagi spermatozoa dan akan mengganggu integritas membran spermatozoa.

Gambar 2 menunjukkan integritas membran spermatozoa setiap perlakuan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Integritas membran merupakan parameter untuk memeriksa keutuhan dari membran spermatozoa. Menurut Ramu dan Jeyendran (2013) parameter integritas membran dapat dilakukan menggunakan uji HOST (*Hypo Osmotic Swelling Test*). Nateq *et al.* (2020) menambahkan bahwa uji HOST dapat memprediksi kemampuan membran spermatozoa dalam menjaga keseimbangan sel dengan lingkungannya. Menurut Anwar *et al.* (2014) rusaknya membran sel dapat mempengaruhi proses metabolisme spermatozoa yang menyebabkan perubahan pada motilitas dan viabilitas spermatozoa. Jika membran plasma sel masih utuh maka metabolisme pun akan berjalan dengan baik, sehingga sel dapat mengatur lalu lintas keluar masuknya semua substrat dan zat elektrolit yang diperlukan oleh sel saat proses metabolisme.

Falchi *et al.* (2018) menjelaskan bahwa apapun jenis pengencer yang digunakan jika semen disimpan dalam waktu yang lama maka motilitas, viabilitas dan integritas membran dari spermatozoa akan cenderung menurun. Hal ini dikarenakan ketersediaan nutrisinya yang semakin berkurang sebab spermatozoa harus tetap melakukan metabolisme selama penyimpanan. Menurut Blengur *et al.* (2020), spermatozoa yang sudah mati mampu menjadi toksik bagi spermatozoa lain yang masih hidup. Hal ini yang menyebabkan nilai kualitas spermatozoa pada perlakuan dengan penambahan air tebu cenderung lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Menurut Erwinda

(2014), didalam air tebu terdapat sukrosa serta gula invert berupa glukosa dan fruktosa yang bisa digunakan oleh spermatozoa mempertahankan motilitasnya selama penyimpanan. Namun demikian, sukrosa merupakan gula disakarida ($C_{12}H_{22}O_{11}$) yang harus disederhanakan dahulu menjadi fruktosa agar dapat digunakan sebagai sumber energi oleh spermatozoa. Hal ini menyebabkan spermatozoa akan lebih menyukai sifat gugus atom yang lebih sederhana seperti fruktosa pada pengencer CEP. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa air tebu yang disubstitusikan ke dalam pengencer CEP memiliki pengaruh terhadap kualitas spermatozoa sapi FH pada penyimpanan beku. Penambahan 25% air tebu menunjukkan hasil terbaik sebagai kandidat pengganti fruktosa pada pengencer CEP dilihat dari persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan penambahan 15%, 20% dan 30% air tebu dari *before freezing* hingga *after freezing*.

4. Kesimpulan dan Saran

Simpulan dari penelitian ini adalah air tebu memiliki pengaruh untuk mempertahankan kualitas spermatozoa sapi FH pada penyimpanan beku. Air tebu dapat dijadikan sebagai kandidat pengganti fruktosa pada pengencer CEP dengan konsentrasi terbaik sebesar 25%. Pada penelitian ini pengencer CEP+25% air tebu dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sebesar $36,49 \pm 0,28\%$; persentase viabilitas sebesar $45,39 \pm 0,33\%$ dan integritas membran sebesar $43,91 \pm 0,21\%$ pasca *thawing*.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Dr. Nur Ducha, S.Si M.Si yang telah membimbing dan teman-teman seperjuangan yang telah mendukung selama proses penelitian.

Daftar Pustaka

- Agarwal, A., Gupta, S. and Sharma, R., 2016. Hypo-Osmotic Swelling Test (HOST). In *Andrological evaluation of male infertility* (pp. 93-96). Springer, Cham.
- Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M., and Ramalho-Santos, J. 2013. Mitochondria functionality and Sperm Quality. *Reproduction*, 146(5), R163-R174.
- Anwar, P., Ondho, Y., dan Samsudewa, D. 2014. Pengaruh Pengencer Ekstrak Air Tebu dengan Penambahan Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Peternakan*. 11(2), 48-58.

- Arsyad, A., Kurniawan, M.E., Khaeruddin, K., dan Syamsuryadi, B. 2021. Karakteristik Semen Segar dan Motilitas Spermatozoa Ayam Hutan Merah (*Gallus gallus*) dalam Pengencer yang Mengandung Air Tebu. *Tarjih Tropical Livestock Journal*, 1(2), 43-50.
- Badan Pusat Statistika, 2019. Statistik Indonesia 2018. Badan Pusat Statistik: Indonesia (Jakarta)
- Banamtuan, A. N., Nalley, W. M., and Hine, T. M. 2021. Kualitas Semen Cair Babi Duroc dalam Pengencer Durasperm yang disuplementasikan Air Buah Lontar dan Sari Tebu. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*, 16(1), 41-48.
- Blengur J, Nalley WM, HineTM. 2020. Pengaruh Penambahan Virgin Coconut Oil dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Selama Preservasi. *Jurnal Nukleus Peternakan* 7(2) : 130-138.
- Bustani, G.S. and Baiee, F.H., 2021. Semen Extenders: An Evaluative Overview of Preservative Mechanisms of Semen And Semen Extender. *Veterinary World*, 14(15), p. 1220.
- Ducha, N, 2018. The Test about Blood Serum Capabilities in Maintaining The Quality of Bull Spermatozoa During Storage in CEP Diluent at Refrigerator Temperature. *Journal Earth and Environmental Science*. Vol 130 : 1-5.
- Ducha, N. 2012. *Suplementasi Kuning Telur dalam Pengencer CEP-2 terhadap Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Limousin selama Penyimpanan pada suhu 4-5°C*. Disertasi tidak diterbitkan. Universitas Negeri Malang: Malang.
- Ducha, N. 2016. Motilitas Spermatozoa dari Semen Sapi yang berbeda selama Penyimpanan pada Suhu 4-5°C dalam Pengencer CEPD dengan Suplementasi Kuning Telur. Artikel tersaji dalam *Prosiding Semnas Biologi 2016*.
- Ducha, N., Susilawati, T., Wahyuningsih, S. And Pangestu, M., 2012. Ultrastructure and Fertilizing Ability of Limousin Bull Sperm after storage in CEP-2 Extender with and without Egg Yolk. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PBJs*, 15(20), pp.979-985.
- Ducha, N., Trinil, S., Aulanni'am dan Sri, W. 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin selama Penyimpanan pada *Refrigerator* dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 7(01) : 1-7.
- Duma, Y., Mumu, M.I., Ladjama, M.R., A'fia, N., Abas, A.M. and Ringgiallo, A., 2021. Effect of Various Diluents on The Quality and Shelf life of Donggala Bull Semen. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 902, No. 1, p.012005). IOP Publishing.
- Engidawork, B., 2018. Artificial Insemination Service Efficiency and Constraints of Artificial Insemination Service in Selected Districts of Harari National Regional State, Ethiopia. *Open Journal of Animal Sciences*, 8(3), pp.239-251.
- Erwinda, M. D., dan Wahono, H. S., 2014. The Effect of Lime Concentration Addition and Cane Juice pH Value on Brown Sugar Quality. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2(3) : 54-64.
- Falchi, L., Galleri, G., Zedda, M.T., Pau, S., Bogliolo, L., Ariu, F. and Ledda, S., 2018. Liquid Storage of Ram Semen for 96 h: Effect on Kinematic Parameters, Membranes and DNA Integrity, and ROS Production. *Livestock science*, 207, pp.1-6.
- Fitriyah, N. Humaidah, D. Suryanto. 2019. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen dalam Pengencer Ringer's Lactat yang disimpan pada suhu 4°C Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Magon. *Jurnal Rekayasa Peternakan* Vol. 1(1) :28-37.

- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Plasma Semen. In Reproduction in Farm Animal. Hafez E.S.E. and B. Hafez (eds). 7 th ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Marryland, USA
- Gliozzi, T.M., Turri, F., Manes, S., Cassinelli, C. and Pizzi, F., 2017. The Combination of Kinetic and Flow Cytometric Semen Parameters as a Tool To Predict Fertility in Cryopreserved Bull Semen. *Animal*, 11(11), pp.1975-1982.
- Herdis, H., Darmawan, I..W.A., dan Rizal, M. 2016. Penambahan Beberapa Jenis Gula dpata Meningkatkan Kualitas Spermatozoa Beku Asal Epididimis Domba (Additional of Various Sugars in Improving Quality of Frozen Thawed Epididymal Spermatozoa of Ram). *Jurnal Kedokteran Hewan- Indonesian Journal of Veterinary Science*, 10(2), 200-204.
- Holden, S.A. and Butler, S.T., 2018. Applications and Benefits of Sexed Semen in Dairy and Beef Herds. *Animal*, 12(s1), pp.s97-s103.
- Indriani, T. S., and Wahyuningsih, S. 2013., Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang dipreservasi dengan Metode Water Jacket dan Free Water Jacket. *Jurnal Veteriner September*, 14(3), pp.379-386.
- Inonie, R. I., Baa, L. O., & Salli, T. 2016. Kualitas Spermatozoa Kambing Boerawa dan Kambing Kacang pada penggunaan Tris-Kuning Telur yang berbeda. *JITRO*. 3(1). 52-64.
- Kalsum, U., 2021. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Gliserol pada Pengencer Skim Kuning Telur terhadap Motilitas, Viabilitas dan Abnormalitas Semen Beku Sapi Limousin. *REKASATWA: Jurnal Ilmiah Peternakan*, 3(2), pp.99-104.
- Kameni, S.L, Meutchieye, F. and Ngoula, F., 2021. Liquid Storage of Ram Semen: Associated Damages and Improvment. *Open Journal of Animal Sciences*, 11(3), pp.473-500.
- Kumaresan, A., Johannison, A., Al-Essawe, E.M. and Morrell, J.M., 2017. Sperm Viability, Reactive Oxygen Spesies, and DNA fragmentation Index combined Can Discriminate Between Above and Below AVERAGE Fertility Bulls. *Journal of dairy science*, 100(7), pp.5824-5836.
- Mahiddine, F.Y., Kim, J.W., Qamar, A.Y., Ra, J.C., Kim, S.H., Jung, E.J. and Kim, M.J., 2020. Conditioned Medium from Canine Amniotic Membrane-derived Mesenchymal Stem Cell Improved Dog Sperm Post-thaw Quality Related Parameters. *Animal*, 10(10), pp.1899.
- Makin, M. 2012. Peforma Sifat-sifat Produksi Susu dan Reproduksi Sapi Perah Fries Hollad di Jawa Barat (Milk Production and Reproduction Peformance of FH Dairy Cattle in West Java). *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjajaran*, 12(2).
- Malinda, D., H. Santoso, H. Latuconsina. 2021. Analisis Viabilitas Spermatozoa Sapi Freisian Holstein (*Bos Taurus*) Post Thawing Semen Beku dengan Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Thawing yang berbeda. *BIOSAINTROPIS* Vol. 6 (2) : 46-51.
- Mohan, J., Sharma, S.K., Kolluri, G. and Dharma, K., 2018. History of Artificial Insemination in Poultry, its Components and Significance. *World's Poultry Science Journal*, 74(3), pp.475-488.
- Mukminat, A., dan Suharyati, S. 2014. Pengaruh Penambahan berbagai sumber karbohidrat pada Pengencer Skim Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 2(2) : 87-92.
- Mulu, M., Moges, N. and Adane, M., 2018. Review on Process, Advantages and Disadvantage of Artificial Insemination in Cattle. *Int J Sci Anim Husb*, 3(6), pp.8-13.

- Nateq, S., Moghaddam, G., Alijani, S. and Behnnam, M ., 2020. The Effect of Different Levels of Nano Selenium on The Quality of Frozen-Thawed Sperm in Ram. *Journal of Applied Animal Research*, 48(1), pp.434-439.
- Ninchan, B. and Noidee, C., 2021. Optimization of Oligofructans from Sugarcane Juice Fermentation Using *Bacillus subtilis* TISTR001. *Agriculture and Natural Resources*, 55(66), pp. 1005-1014.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J. and England, G.C., 2018. *Artur's Veterinary Reproduction and Obstetrics-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Nugroho, A.D., Rahmatullah, M. H, dan Savitri, N. 2019. Menuju Swasembada Susu Tahun 2024. *Sekolah Tinggi Ilmu Statistik, Jakarta*.
- Nugroho, Y., Susilawati, T. and Wahyuningsih, S., 2014. Kualitas semen sapi Limousin selama Pendinginan menggunakan Pengencer CEP-2 dengan penambahan berbagai Konsentrasi Kuning Telur dan Sari Buah Jambu biji (*Psidium guajava*). *TERNAK PROPIKA Journal of Tropical Animal Production*, 15(1), pp.31-42.
- Purwoistri, R.F., Susilawati, T. and Rahayu, S., 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan Cauda Epididymal Plasma-2 ditambahkan Kuning. *Jurnal Veteriner*, 14(3), pp.371-378.
- Ramu, S. and Jeyendran, R.S., 2013. The Hypo-Osmotic Swelling Test For Evaluation of Sperm Membrane Integrity. In *Spermatogenesis* (pp. 21-25). Humana Press, Totowa, NJ.
- Raspa, M., Fray, M., Paoletti, R., Montoliu, L., Giuliani, A., Scavizzi, F. and EMMA/Infrafrontier Technical Working Group, 2018. Long Term Maintenance of Frozen Mouse Spermatozoa at -80°C. *theriogenology*, 107., pp. 41-49.
- Ribeiro, J.C., Carrageta, D.F., Bernardino, R.L., Alves, M.G. and Oliveira, P.F., 2022. Aquaporins and Animal Gamete Cryopreservation: Advances and Future Challenges. *Animals*, 12(3), p. 359.
- Riski, P., Purwanto, B. P., & Atabany, A. 2016. Produksi dan kualitas susu sapi FH laktasi yang diberi pakan daun pelepah sawit. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 4(3), 345-349.
- Riyadhi, M. 2020. Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Asal Epididimis Sapi Persilangan yang diencerkan dengan Air Tebu. *Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Asal Epididimis Sapi Persilangan yang diencerkan dengan Air Tebu*.
- Rochmi, S.E. and Sofyan, M.S., 2019. A Diluent Containing Coconut Water, Fructose, and Chicken Egg Yolk Increase Rooster Sperm Quality at 5°C. *Veterinary World*, 12(7), pp.1116.
- Sitepu, S.A., Udin, Z., Jaswandi, J. and Hendri, H., 2018. Quality Different of Boer Liquid Storage with Addition Sweet Orange Essential Oil in Tris Yolk and Gentamicin Extender. *Jcrs(Journal of Comunity Research and Service)*, 1(2), pp.78-82.
- Swelum, A.A.A., Saadeldin, I.M., Ba-Awad, H. and Alowaimier, A.N., 2018. Effects of Melatonin Implants on The Reproductive Performance and Endocrine Fuction of Camel (*Camelus dromedarius*) Bulls During The Non Breeding and Subsequent Breeding Seasons. *Theriogenology*, 119, pp.18-27.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., Dewulf, J., De Pauw, I. And De Kruif, A., 2004. Storage of Fresh Bovine Semen in a Diluent based on the Ionic Composition of Cauda Epididymal Plasma (CEP). *Preservation of Fresh Bovine Semen and Uterotubal Junction Insemination in Cattle*, 39,p.63.

- Yaghoobi, M., Azizi, M., Mokhtare, A., Javi, F. and Abbaspourrad, A., 2022. Rheotxis Quality Index: A new Parameter that Reveals Male Mammalian In Vivo Fertility and Low Sperm DNA Fragmentation. *Lab on a Chip*.
- Yan, B., Zhang, X., Wang, J., Jia, S., Zhou, Y., Tian, J., Wang, H. and Tang, Y., 2020. Inhibitory Effect of Lycium Barbarum Polysaccharide on Sperm Damage during Cryopreservation. *Experimental and therapeutic medicine*, 20(4), pp.3051-3063.
- Yohana, T., Nur D., Rahardjo. 2014 Pengaruh Pengencer Sintetis dan Alami terhadap Motilitas Spermatozoa Sapi Brahman selama Penyimpanan dalam Suhu Dingin. *Jurnal LenteraBio*.3(3): 261-265.
- Zuidema, D., Kerns, K. and Sutovsky, P., 2021. An Exploration of Current and Perspective Semen Analysis and Sperm Selection for Livestock Artificial Insemination. *Animal* 11(12), p.3563.