



Evaluasi Motilitas, Viabilitas dan Abnormalitas Spermatozoa Babi dalam Berbagai Modifikasi Pengencer

Evaluation of Motility, Viability and Abnormality of Boar Spermatozoa in Various Modified Extenders

Hermilinda Parera^{1*}, Victor Lenda¹

¹ Kupang State Agricultural Polytechnic Animal Health Study Program. Jl. Prof. Dr. Herman Yohanes, Lasiana Kupang

* Corresponding Author. E-mail address: milindaparera81@gmail.com

ARTICLE HISTORY:

Submitted: 25 November 2022

Accepted: 7 March 2023

KATA KUNCI:

Abnormalitas

Motilitas

Pengencer semen

Spermatozoa babi

Viabilitas

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah melakukan penilaian kualitas spermatozoa semen babi selama penyimpanan dan menentukan bahan pengencer mana yang harus digunakan dan berapa lama semen babi dapat disimpan. Semen babi hasil ejakulasi diperoleh dari pejantan peranakan Duroc berusia dua tahun, diencerkan dengan bahan pengencer Beltsville (BTS) dan Tris Citrat Fructose (TCF) yang telah dimodifikasi dengan kuning telur (KT) 5% dan Ekstrak Mesocarp (EM) *Borassus flabellifer* linn (EM) 0,01% dan disimpan pada suhu 13°C selama 4 hari. Penelitian eksperimental dengan rancangan acak lengkap dengan empat kelompok dan lima kali ulangan. Parameter yang diamati adalah motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Motilitas dan abnormalitas diamati menggunakan mikroskop fase-kontras dengan perbesaran 400X, pemeriksaan viabilitas menggunakan pewarnaan eosin nigrosin. Data parametrik dianalisis dengan ANOVA dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan penambahan kuning telur 5% dalam kelompok perlakuan berbasis pengencer BTS menunjukkan persentase motilitas lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan tanpa kuning telur, sedangkan pada kelompok pengencer berbasis TCF tidak menunjukkan adanya perbedaan ($P < 0.05$). Modifikasi pengencer Tris Citrat Fruktosa yang disuplementasi 5% kuning telur dan ekstrak mesocarp 0,01% mampu mempertahankan persentase viabilitas ($67,50 \pm 2,0$) lebih tinggi secara signifikan ($P < 0.05$) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, dan memiliki persentase abnormalitasnya (9.75 ± 0.957), lebih rendah signifikan ($P < 0.05$) dibandingkan kelompok lainnya. Disimpulkan bahwa modifikasi pengencer TCF+kuning telur 5%+ekstrak mesocarp 0.01% memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan kualitas semen dengan persentase motilitas dan viabilitas paling tinggi serta persentase abnormalitas terendah dibandingkan ketiga pengencer lainnya. Demikian pula, semua kelompok modifikasi pengencer BTS dan TCF dengan suplementasi kuning telur dan ekstrak mesocarp dalam penelitian ini mampu mempertahankan motilitas $>40\%$, viabilitas $>45\%$ dan abnormalitas $<20\%$ sehingga layak dipakai dalam prosedur IB.

ABSTRACT

The purpose of this study was to conduct an assessment on the quality of pig semen spermatozoa during storage and determine which diluent material should be used and how long pig semen can

KEYWORDS:

Boar spermatozoa

Semen extender

Motility
Abnormality
Viability

be stored. Freshly ejaculated boar semen was obtained from a two-years-old Duroc male and was diluted with Beltsville Thawing Solution (BTS) and Tris Citrate Fructose (TCF) supplemented with 5% egg yolk (KT) and extract of *Borassus flabellifer* Linn mesocarp (EM) 0.01% and stored at 13°C for up to 4 days. An experimental study with a completely randomized design with four groups and five repeats was applied. Parameters observed were motility, viability and abnormality of spermatozoa. Sperm quality was evaluated by examining motility and abnormality using a phase-contrast microscope with a magnification of 100X, and viability by eosin nigrosine staining. Parametric data were analyzed with ANOVA followed by Duncan test. The results showed that the supplementation of 5% egg yolk in the BTS diluent-based treatment group showed a higher percentage of motility ($P<0.05$) than without egg yolk, while the TCF-based diluent group showed no differences ($P<0.05$). Modified-Tris Citrate Fructose diluent supplemented with 5% egg yolk and 0.01% mesocarp extract was able to maintain a significantly higher percentage of viability (67.50 ± 2.0) ($P<0.05$) than other groups, and had a percentage of abnormalities (9.75 ± 0.957), significantly lower ($P<0.05$) than other groups. It was concluded that the modification of diluent TCF with 5% egg yolk and mesocarp extract 0.01% provide the best results in maintaining sperm quality with the highest percentage of sperm motility and viability, and the lowest percentage of sperm abnormality compared to the other three diluents. Likewise, all groups of modified-BTS and TCF diluent supplemented with 5% egg yolk and extract of *Borassus flabellifer* Linn mesocarp in this study were able to maintain motility $>40\%$, viability $>45\%$ and abnormalities $<20\%$ so they were appropriate for using in the AI procedure.

© 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/>

1. Pendahuluan

Nusa Tenggara Timur sebagai salah satu provinsi dengan populasi babi terbanyak di Indonesia mengalami kerugian akibat wabah ASF tahun 2019 dengan total kerugian diperkirakan mencapai 168 miliar rupiah dengan harga rata-rata 5 juta per ekor (Malo Bulu *et al.*, 2022). Saat ini usaha peternakan babi baik skala menengah maupun kecil khususnya di kabupaten Kupang dan sekitarnya mulai bangkit lagi untuk memenuhi kebutuhan masyarakat baik sebagai sumber protein maupun untuk keperluan upacara adat dan keagamaan. Hal ini terlihat dari tingginya permintaan pelayanan Inseminasi Buatan (IB) oleh masyarakat, namun tidak disertai dengan tersedianya sumber semen berkualitas baik

Saat ini, selain metode kawin alam, penerapan bioteknologi reproduksi seperti IB dan teknologi pengolahan semen sangat dibutuhkan dalam mendukung upaya peningkatan populasi ternak babi. Inseminasi Buatan merupakan salah satu teknik dalam bioteknologi reproduksi yang efektif tidak hanya untuk meningkatkan populasi ternak, tetapi juga mampu memperbaiki mutu genetic dan menjadi solusi keterbatasan pejantan

unggul di daerah. Pelayanan IB pada babi, di wilayah Kupang dan sekitarnya masih menggunakan semen segar yaitu semen yang ditampung dari pejantan dan dikemas dalam botol, kemudian dibawa ke lapangan untuk langsung digunakan dalam pelayanan IB. Pola seperti ini kurang efektif dan efisien, karena jika permintaan semen (IB) cukup tinggi dalam sehari, tentunya membutuhkan banyak pejantan, padahal biaya pemeliharaan pejantan juga cukup tinggi. Selain itu, dengan keterbatasan jumlah pejantan, maka peternak (produsen semen) melakukan penampungan semen setiap hari untuk memenuhi permintaan, sehingga berdampak pada penurunan kualitas semen. Kendala lain yang dihadapi adalah karakteristik semen segar babi yang dihasilkan tidak dapat disimpan dalam waktu lama. Oleh karena semen segar babi tidak dapat bertahan lebih dari 24 jam, maka produsen semen akan melakukan penampungan semen maksimal satu jam sebelum waktu pelayanan IB. Semen babi berbeda dengan semen ternak lain karena sangat sensitif terhadap cold shock sehingga kualitas semen babi akan menurun setelah penampungan bila tidak ditangani dengan baik. Usaha untuk mempertahankan kualitas semen dan memperbanyak hasil ejakulasi dari pejantan unggul adalah dengan melakukan pengenceran semen menggunakan beberapa bahan pengencer. Syarat setiap bahan pengencer adalah harus mampu menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, memungkinkan spermatozoa bergerak secara progresif, tidak bersifat racun bagi spermatozoa, menjadi penyangga bagi sperma, dapat melindungi sperma dari kejutan dingin (*cold shock*) baik untuk semen beku maupun semen yang tidak dibekukan (semen cair). Bustani dan Baiee (2021), mengatakan spermatozoa tidak bisa hidup untuk waktu yang lama kecuali bila ke dalam semen ditambahkan berbagai unsur yang memiliki fungsi menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa, melindungi spermatozoa dari cold shock, menyediakan suatu penyangga untuk mencegah perubahan pH akibat pembentukan asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa, mempertahankan tekanan osmotik, dan keseimbangan elektrolit yang sesuai, serta mencegah perkembangan kuman. Lebih lanjut Martins *et al.* (2020) melaporkan pengencer semen dapat memperbanyak volume semen atau memperbanyak dosis IB serta dapat memperpanjang lama simpan.

Bahan pengencer yang baik harus dapat memperlihatkan kemampuannya dalam menghambat penurunan nilai motilitas (gerak progresif) dan daya hidup sperma sehingga pada akhirnya mampu memperpanjang lama waktu penyimpanan pasca pengenceran.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh modifikasi pengencer selama masa preservasi 4 hari pada suhu 13°C terhadap kualitas semen babi yang meliputi persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah terkait jenis pengencer terbaik yang dapat digunakan dalam pelayanan IB.

2. Materi dan Metode

Penelitian ini terdiri dari empat kelompok dengan lima kali ulangan. Semen dibagi menjadi empat kelompok perlakuan yaitu Kelompok I (semen segar + BTS+ 5% Kuning telur + ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01%); Kelompok II (semen segar +BTS+ ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01%); Kelompok III (Semen segar+ TCF+ 5% Kuning Telur+ ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01%) dan Kelompok IV (Semen segar+TCF+ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01%). Keempat kelompok perlakuan disimpan selama 4 hari pada suhu 13°C. Selama penyimpanan setiap hari dilakukan evaluasi motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa.

2.1. Materi

Alat penelitian berupa timbangan digital, aluminium foil, kertas saring (Whatman 150 mm), timbangan analitik, erlenmeyer (Pyrex) 100 mL, glass ukur (Pyrex), corong, *disposable syringe* (Onemed) ukuran 1 mL dan 5 mL, thermometer air, thermometer kulkas, lemari pendingin (Sanyo), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung, obyek glass, cover glass, pembakar Bunsen, pipet tetes, kamar hitung Neubauer.

Bahan penelitian terdiri dari 50 gram pengencer BTS (Minitube), *Tris citrate fructose* terdiri dari *Tris hydroxymethyl aminomethane* (Merck E30000206, Germany), *Citric acid monohydrate* (Merck K52924344, Germany), D-(-)Fructose (HiMedia, 0000508156) Penicillin 1.000.000 IU dan streptomycin (Piripen), Aquabidest, kuning telur ayam, ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn, Eosin nigrosin, dan Alkohol 70%

2.2. Metode

Penelitian ini menggunakan semen yang berasal dari pejantan babi Peranakan Duroc, umur ± 2 tahun, memiliki kualitas semen yang bagus. Pejantan ini berasal dari pembibitan rakyat Jaydeni *Farm* dusun Kaniti, kabupaten Kupang. Semen dikoleksi dengan metode masase, kemudian dievaluasi di laboratorium Anatomi Patologi Politani Kupang.

2.2.1. Persiapan Kuning Telur

Kuning telur diperoleh dari telur ayam segar, sebelumnya telur dicuci dengan sabun, dikeringkan dan disterilisasi menggunakan alkohol 70%, kemudian dibilas menggunakan aquabidest dan dikeringkan. Selanjutnya dilakukan pemisahan kuning telur utuh dari albumin menggunakan kertas saring hingga terpisah sepenuhnya.

2.2.2. Pembuatan Pengencer

Pembuatan 100 ml pengencer tris citrate fruktosa yang disuplementasi 5% kuning telur dan 0,01% ekstrak mesocarp menggunakan komposisi 1,6 g Tris, 0,9 g citric acid, 3,9g Fructosa, 95 ml aquabidest, 1% penisilin streptomycin, 5ml kuning telur dan 1ml ekstrak mesocarp, sedangkan untuk 100 ml pengencer TCF yang disuplementasi 0,01% ekstrak mesocarp dibuat dari komposisi 1,6 g Tris; 0,9 g citric acid; 3,9 g Fructosa; 100 ml *aquabidest*; 1% penisilin streptomycin; dan 1 ml ekstrak mesocarp. Komposisi pengencer 100 ml BTS yang disuplementasi 5% kuning telur terdiri dari 4,75gBTS, 95ml *aquabidest*, 5ml kuning telur dan 1 ml ekstrak mesocarp, sedangkan pengencer BTS dengan 0,01% ekstrak dibuat dari 5g BTS, 1ml ekstrak dan 100 ml *aquabidest*.

2.2.3. Pengamatan Motilitas

Pengukuran motilitas dilakukan dengan meletakkan satu tetes semen di atas objek glass dan menutupnya dengan kaca penutup lalu diamati dengan mikroskop fase kontras dengan pembesaran 200x sampai 400x. Penilaian motilitas yang bergerak maju dan progresif dinilai oleh dua individu kemudian diambil rata-ratanya (Brinsko *et al.*, 2011).

2.2.4. Pengamatan Viabilitas

Pemeriksaan viabilitas semen segar diawali dengan membuat apusan semen menggunakan objek glass. Preparat apusan semen dibuat dari campuran 1 tetes semen

dengan 1 tetes pewarna eosin negrosin, apusan difiksasi dengan api. Perhitungan spermatozoa dilakukan menggunakan mikroskop fase kontras (1000x). Dilakukan evaluasi sebanyak 100 spermatozoa, spermatozoa mati akan berwarna merah sedangkan spermatozoa hidup berwarna transparan (Engidawork, 2018; Ratnawati *et al.*, 2017)

2.2.5. Pengamatan Abnormalitas

Abnormalitas spermatozoa dapat diklasifikasikan menjadi tiga bagian yaitu abnormalitas pada kepala, bagian tengah dan ekor. Abnormalitas pada kepala seperti terlalu besar atau kecil, runcing atau tumpul, kepala dua. Abnormalitas pada bagian tengah seperti bagian leher tebal atau tipis, leher yang bengkok serta abnormalitas pada ekor seperti ekor bengkok, ekor pendek, atau melingkar dari ujung ekor (Čeřovský *et al.*, 2005). Identifikasi normal dan abnormalitas spermatozoa sampai dengan 100 spermatozoa. Jumlah spermatozoa abnormal yang didapatkan, dibagi dengan jumlah total spermatozoa yang diamati dan dikalikan 100% (Ax R.L., 2008; Molla Tanga *et al.*, 2021)

2.2.6. Analisa Data

Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap menggunakan empat kelompok pengencer dengan lima kali ulangan. Evaluasi dilakukan terkait parameter motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa setelah pengenceran dan selama penyimpanan. Semua data dianalisa dengan *analysis of variance* (ANOVA), bila terdapat beda nyata maka dilanjutkan dengan uji Duncan.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Karakteristik Semen Segar

Semen segar yang digunakan pada penelitian ini adalah semen segar yang diperoleh dari pejantan peranakan *Duroc* berumur 2 tahun. Hasil penilaian semen segar merupakan pemeriksaan awal penentuan kelayakannya untuk diproses lebih lanjut. Semen segar yang akan digunakan dinilai baik secara makroskopis dan mikroskopis. Data hasil pemeriksaan semen yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kualitas Semen segar Babi Peranakan Duroc

Pemeriksaan	Hasil
Makroskopis	
Volume	203,33±24,73 ml
Warna	Putih Susu
pH	±7
Konsistensi	Cair
Bau	Khas Babi
Mikroskopis	
Gerakan Massa	+++
Motilitas	90%
Konsentrasi	300 X 10 ⁶ sel/mL
Abnormalitas	4,38±0.719%
Viabilitas	98%

Keterangan: +++ = Sangat baik; terlihat seperti gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif

Berdasarkan **Tabel 1**, terlihat volume semen babi sebesar 203,33±24,73 ml, dengan rerata motilitas 90%, tidak jauh berbeda dengan penelitian (Kondracki *et al.*, 2012) yang mengatakan babi duroc memiliki volume ejakulasi 185.28 ± 57.03% motilitas 80%, viabilitas 93%. Pada penelitian ini semen babi berwarna putih susu dengan konsentrasi spermatozoa sebesar 300 x 10⁶ dan memiliki pH rata-rata 7,40±0,2. Semen babi bersifat voluminous, dengan volume semen tinggi mencapai 150- 200 mL, dan motilitas spermatozoa diatas 60%, dengan kosentrasi spermatozoa yang rendah yaitu 200-300 x 10⁶ sel/mL (Ax R.L., 2008; Gadea, 2003; Knox, 2016) Lebih lanjut Frunzä et al. (2008) menyatakan bahwa warna normal semen babi hasil ejakulasi berwarna putih kebiruan. Warna semen babi menggambarkan tingkat kekentalan semen. Dalam kondisi normal semakin pekat warna semen yang terlihat, maka semakin kental konsistensi semen tersebut. Penurunan konsentrasi spermatozoa menyebabkan warna semen menjadi terlihat jernih

Sejumlah penelitian melaporkan bahwa agar semen dapat diproses lebih lanjut harus memenuhi sejumlah syarat seperti, memiliki volume lebih dari 150 ml, motilitas lebih dari 60%, presentase spermatozoa hidup 65% dan presentase abnormal spermatozoa tidak lebih dari 20% (Luh *et al.*, 2021; Stradivari *et al.*, 2019). Berdasarkan kajian tersebut, hasil pemeriksaan karekteristik semen segar dalam penelitian ini dapat dilanjutkan dengan proses pengenceran

3.2. Motilitas Spermatozoa Babi Dalam Berbagai Modifikasi Pengencer yang Dipreservasi Pada Suhu 13°C Selama 4 Hari

Motilitas spermatozoa adalah penilaian pergerakan spermatozoa yang bergerak progresif secara visual dengan mikroskop atau menggunakan sistem otomatis dengan bantuan komputer (*computer assisted semen analysis/CASA*) (Dominiek *et al.*, 2011). Hasil evaluasi motilitas spermatozoa secara visual menunjukkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa dalam berbagai pengencer disajikan dalam **Tabel 2**.

Tabel 2. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa dalam berbagai modifikasi pengencer yang dipreservasi pada suhu 13°C selama 4 hari

Peubah (%)	Lama Simpan (Hari)	A1 (BTS+ KT5%+EM0,01)	A2 (BTS+ EM0,01%)	B1 (TCF+ KT5%+EM0,01)	B2 (TCF+EM0,01%)
Motilitas	1	75±9,13 ^a	75±7,07 ^a	80±7,07 ^a	80±7,07 ^a
	2	72,50±2,887 ^a	61,25±4,78 ^b	72,5±6,45 ^b	72,5±8,66 ^b
	3	60±8,16 ^b	55 ±408 ^b	71,25±4,78 ^{4b}	67,50±4,08 ^b
	4	44,5±4,203 ^c	42,50±10,40 ^c	47,5±2,89 ^c	45,75±2,99 ^c
Rataan±SD		63±13,83^a	58,44±13,62^b	67,81±13,53^a	66,44±14,43^a

Keterangan: Superskrip huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$). Superskrip huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$)

Hasil analisis statistik menunjukkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa pada kelompok A2 berbeda nyata ($P<0,05$) lebih rendah dibandingkan kelompok A1, B1 dan B2. Rata-rata persentase motilitas kelompok A2: 58,44±13,62% dan A1: 63±13,83%, B1: 67,81±13,53%, B2: 66,44±14,43%. Demikian pula, persentase motilitas pada hari ke-4 dari kelompok A2 (42,5±10,40%) lebih rendah ($P<0,05$) dibandingkan dengan kelompok A1 (44,50±4,20); B1 (47,5±2,89) dan B2 (45,75±2,99%).

Penurunan motilitas pada kelompok perlakuan A2 dengan modifikasi pengencer BTS+EM 0,01% terjadi lebih cepat dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain disebabkan pengencer *Beltsville Thawing Solution* (BTS) merupakan jenis pengencer yang bersifat *short term*, dengan komposisi nutrisi dan penyangga dapat bertahan selama 3 hari sehingga semen hanya dapat disimpan selama 1-3 hari pada suhu 17°C (Johnson *et al.*, 2000). Selama proses penyimpanan terjadi proses metabolik dimana sel-sel spermatozoa menghasilkan asam laktat sebagai hasil sampingan yang dapat menyebabkan perubahan pH pada medium sekitarnya kemudian akan menyebabkan kematian spermatozoa. Komposisi BTS belum memiliki kandungan yang mampu

melindungi sel spermatozoa dari serangan radikal bebas yang sering juga disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Penambahan ekstrak mesocarp 0,01% dalam pengencer BTS dapat menghambat kematian spermatozoa dengan menghambat proses pembentukan ROS selama proses penyimpanan namun penambahan ekstrak mesocarp saja belum cukup untuk mencegah kerusakan struktur, fungsi dan integritas membran spermatozoa akibat adanya penurunan suhu selama proses penyimpanan. Radomil *et al.* (2011), menyatakan bahwa membran plasma spermatozoa babi sangat sensitif terhadap perubahan temperatur selama proses penyimpanan pada suhu dingin hal ini terkait dengan komposisi lipid dengan kandungan asam lemak tak jenuh yang mudah menurun drastis selama proses penyimpanan dingin sehingga menyebabkan kerusakan struktur, fungsi dan integritas membran dan berpengaruh terhadap penurunan motilitas.

Berbeda dengan modifikasi pengencer A1 (BTS+5%KT+EM 0,01%) adanya penambahan kuning telur memberikan hasil persentase motilitas yang lebih tinggi (68 ± 13.83), dibandingkan kelompok pengencer BTS+EM 0.01% tanpa kuning telur. Demikian juga, motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan dengan modifikasi pengencer TCF+5%KT+EM 0,01% lebih tinggi ($67,81 \pm 13,53\%$), namun tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan TCF+EM 0.01% tanpa kuning telur ($66,44 \pm 14,43\%$). Penambahan kuning telur dalam pengencer BTS maupun TCF yang disuplementasi EM 0.01% mampu mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein sel spermatozoa sehingga dapat bertahan dari cekaman dingin, karena kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin (Wang *et al.*, 2012). Lebih lanjut menurut Bustani dan Baiee (2021), kandungan lesitin (phosphatidil cholin) dalam kuning telur berfungsi sebagai membran *coating* untuk mempertahankan konfigurasi normal phospholipid bilayer sebagai penyusun utama membran sel spermatozoa. Kuning telur juga mengandung fraksi low-density lipoprotein (LDL) yang bertanggung jawab untuk perlindungan terhadap *cold shock*.

Spermatozoa merupakan sel yang sangat peka terhadap oksidasi. Umumnya sel dilindungi dari kerusakan oksidatif oleh adanya antioksidan dalam sitoplasma pada bagian mid piece (Ochsendorf, 1998). Pada membran plasma spermatozoa mudah terjadi peroksidasi lipid karena kandungan asam lemak tak jenuh tinggi sehingga menyebabkan hilangnya asam lemak tak jenuh yang berperan dalam fluiditas membran plasma untuk

motilitas (Baumber *et al.*, 2003). Senyawa ROS terbentuk dari aktivitas metabiolisme sel selama prosesing semen mulai dari penampungan, pengenceran dan penyimpanan (Chatterjee *et al.*, 2001). Pada sel spermatozoa, sumber ROS berasal dari kontaminasi leukosit dalam semen, spermatozoa immature dan abnormalitas spermatozoa (Taufiqurrachman, 2012). Tingginya kadar ROS menyebabkan terganggunya fungsi mitokondria sebagai sintesis ATP berdampak menurunnya ATP yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa sehingga berdampak pada fosforilasi aksonemal yang tidak mencukupi, peroksidasi lipid dan penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa (Bansal dan Bilaspuri, 2010; Baumber *et al.*, 2000).

Ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01% mengandung antioksidan β karoten sehingga penambahan ekstrak mesocarp dalam pengencer BTS dan TCF pada penelitian ini, mampu memperpanjang masa penyimpanan hingga 4 hari pada suhu 13°C, karena mampu menghambat reaksi peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa. Menurut Pryor *et al.* (2000) β karoten merupakan salah satu senyawa antioksidan yang mengikat radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif dan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipida pada membran plasma sel, sehingga memungkinkan digunakan dalam pengencer semen. Oleh karena itu, penambahan antioksidan dalam pengencer dapat meminimalisir pembentukan ROS dan melindungi fungsi membran plasma spermatozoa. Idayati *et al.* (2014) melaporkan kandungan anti oksidan dalam ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn berupa senyawa β karoten mencapai 6217,48 $\mu\text{g}/100\text{g}$, sehingga spesies ini memiliki potensi tinggi sebagai sumber antioksidan.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa persentase motilitas dari keempat kelompok perlakuan masih memenuhi persyaratan persentase motilitas spermatozoa minimal 40% yang digunakan dalam pelayanan IB (Sumardani *et al.*, 2008). Hal ini membuktikan penggunaan modifikasi bahan pengencer dalam kelompok perlakuan dapat digunakan sebagai pengencer semen babi.

3.3. Viabilitas Spermatozoa Babi dalam berbagai Modifikasi pengencer yang dipreservasi pada suhu 13°C selama 4 hari.

Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa yang diketahui dengan mengamati jumlah spermatozoa hidup dan mati dengan pewarnaan eosin negrosin (Agarwal *et al.*, 2016). Spermatozoa yang mati akan menyerap larutan eosin menjadi merah muda sedangkan

spermatozoa yang hidup tampak transparan atau tidak berwarna (Lubis dan Arifiantini, 2014; Bebas *et al.*, 2016). Persentase viabilitas spermatozoa babi dalam berbagai modifikasi pengencer dalam penelitian ini disajikan dalam **Tabel 3**.

Tabel 3. Persentase viabilitas spermatozoa babi dalam berbagai modifikasi pengencer yang di preservasi pada suhu 13°C selama 4 hari.

Peubah (%)	Lama Simpan (Hari)	A1 (BTS+KT%+EM0,015)	A2 (BTS+EM0,01%)	B1 (TCF+KT5%+EM0,01%)	B2 (TCF+EM0,01%)
Viabilitas	1	84± 0,81 ^{aB}	81± 1,155 ^{aA}	85,75 ±0,95 ^{aC}	82,50±0,577 ^{aB}
	2	80± 0,81 ^{bB}	78,50±2,08 ^{bA}	81±1,82 ^{bC}	78,75±1.708 ^{bB}
	3	71,75± 2,63 ^{cB}	69,50± 2,88 ^{cA}	75,50±1,29 ^{cC}	69,50±3,17 ^{cB}
	4	51,75±2,06 ^{dB}	45,25±1,708 ^{dA}	67,50±2,082 ^{dC}	60,50± 2,38 ^{dB}
Rataan±SD		71,88±12,93 ^B	68,56±14,701 ^A	77,44±7,15 ^C	72,81±9,042 ^B

Keterangan: Superskrip huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$). Superskrip huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$)

Berdasarkan hasil penelitian yang disajikan pada (**Tabel 3**) terlihat adanya perbedaan viabilitas atau daya hidup spermatozoa dalam berbagai modifikasi pengencer. Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa pada modifikasi pengencer TCF+KT5%+EM0,01% sebesar 77,44%, berbeda nyata lebih tinggi ($P<0,05$) dibanding ketiga kelompok pengencer lainnya, yaitu pengencer TCF+0,01% EM (72,81%), pengencer BTS+5%KT+0,01%EM (71,88%), dan pengencer BTS+0,01%EM(68,56%).

Pengencer *tris citrate fructose* dengan kuning telur 5% dan ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01% merupakan modifikasi pengencer terbaik karena dapat mempertahankan persentase viabilitas tertinggi yaitu 67,50% selama 4 hari pada suhu 13°C, berbeda dengan penelitian Amtiran *et al.* (2020), persentase viabilitas spermatozoa babi *duroc* dalam pengencer tris citrate kuning telur yang disuplementasi vitamin E 2% hanya memiliki viabilitas sebesar 45,45% selama 56 jam pada suhu 18-20°C.

Pengencer TCF+KT5%+EM0,01% memiliki komponen dalam jumlah yang lengkap dan cukup untuk digunakan selama proses penyimpanan bagi kelangsungan hidup spermatozoa babi. Komponen yang terdapat dalam pengencer ini menyediakan sumber nutrisi, lestin, lipoprotein, fosfolipid, buffer pengatur pH dan antioksidan untuk mencegah ROS. Berbeda dengan pengencer TCF+EM0,01%, persentase viabilitas spermatozoa lebih rendah dalam bahan pengencer tersebut karena komponen dibutuhkan untuk

kelangsungan hidup spermatozoa babi selama proses penyimpanan pada suhu dingin tidak lengkap atau tidak cukup sehingga berpengaruh pada penurunan viabilitas spermatozoa.

Bahan pengencer Tris sitrat fruktosa merupakan bahan kimia yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Tris aminomethan merupakan buffer yang umum digunakan karena memiliki kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah dalam konsentrasi yang tinggi (Tethool *et al.*, 2022). Namula *et al.* (2019) menyatakan tris berperan sebagai pengatur pH dalam pengencer semen babi. Selama proses penyimpanan terjadi perubahan pH sperma yang dapat mempengaruhi laju metabolisme, motilitas dan viabilitas sperma serta kemampuannya untuk membuahi oosit (Muvhali *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2015). Asam sitrat berperan dalam proses viskositas pH semen sehingga dapat mempengaruhi motilitas sperma (Wahyudi *et al.*, 2016). Fruktosa selain sebagai sumber energi juga untuk mempertahankan tekanan osmotik dari larutan pengencer serta mempertahankan integritas membran plasma utuh (Tsujii *et al.*, 2006)

Penggunaan bahan kimia sebagai pengencer semen harus ditambahkan dengan kuning telur, mengingat bahwa komponen bahan kimia saja tidak cukup untuk melindungi spermatozoa. Kuning telur mengandung asam-asam amino dan berperan menjaga integritas selubung lipoprotein membran spermatozoa. Tarig *et al.* (2017) mengatakan kuning telur memiliki komponen karbohidrat, vitamin dan mineral yang berfungsi untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa dan mengandung senyawa lipoprotein dan lesitin yang berperan untuk melindungi spermatozoa dari *cold shock*. *Cold shock* pada spermatozoa saat fase penyimpanan dapat merusak komposisi membran plasma spermatozoa yang salah satunya terdiri dari phospholipid menyebabkan keluarnya enzim aspartat-aminotransferase (AspAT) yang akan mengakibatkan berhentinya produksi adenine triphosphate (ATP) sehingga spermatozoa tidak dapat bergerak (Sumardani *et al.*, 2008). Penambahan ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01% sebagai sumber berperan menghambat terjadinya reaksi oksidatif (ROS). Parera *et al.* (2019), melaporkan antioksidan yang terkandung dalam ekstrak mesocarp buah lontar (*Borassus flabellifer* Linn) dapat mengikat oksigen radikal yang terdapat didalam sel, sehingga dapat mencegah terjadinya reaksi peroksidasi lipid yang dapat menurunkan daya hidup spermatozoa.

Modifikasi pengencer BTS+KT5%+EM 0,01% belum mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa babi sebaik modifikasi pengencer TCF+KT5%+EM0,01% disebabkan karena komposisi BTS hanya mampu mempertahankan viabilitas spermatozoa selama 3 hari. Penambahan 5% kuning telur belum cukup melengkapi kekurangan energi dalam kandungan BTS sehingga tidak dapat memperpanjang masa penyimpanan (>3hari). Demikian pula, pengencer BTS+EM 0,01% menunjukkan penurunan persentase viabilitas spermatozoa lebih cepat karena jumlah dan komponen penyusun pengencer yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup spermatozoa belum cukup atau tidak lengkap, seperti tidak adanya kuning telur sebagai penyedia nutrisi maupun lipoprotein dan lesitin yang dapat melindungi membrane plasma dari kerusakan akibat *cold shock*, sehingga terjadi penurunan integritas membran spermatozoa dan berdampak pada penurunan kualitas sperma.

Lama penyimpanan semen dalam berbagai modifikasi pengencer juga berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa babi. Modifikasi pengencer Tris Citrat Fruktosa yang disuplementasi 5% kuning telur dan ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01% dapat mempertahankan persentase viabilitas spermatozoa babi sebesar 67,50 % selama 4 hari sedangkan ketiga pengencer lain yaitu BTS+KT5%+EM0,01% memiliki viabilitas 51,75%, TCF+ EM0,01% (60,5%), dan BTS+ EM0,01% (45,25%). Tingginya viabilitas spermatozoa dalam pengencer TCF+5%KT+0,01%EM karena selama penyimpanan semen pada suhu dingin kerusakan membrane plasma yang dapat berpengaruh terhadap integritas membrane dicegah dengan penambahan kuning telur yang mengandung lesitin dan lipoprotein selain itu selama penyimpanan reaksi osisidatif spesifik akibat kematian spermatozoa dihambat sehingga memperpanjang masa hidup spermatozoa dan berdampak pada tingginya viabilitas spermatozoa.

Jika dibandingkan antara persentase motilitas dan viabilitas dalam modifikasi pengencer dan lama penyimpanan, persentase spermatozoa hidup (viabilitas) lebih tinggi dari spermatozoa motil karena dari sejumlah spermatozoa hidup belum tentu semua motil progresif. Dongkot *et al.* (2022); Tamoës *et al.* (2014); dan Yusuf *et al.* (2017), menyebutkan viabilitas spermatozoa babi berbeda terhadap motilitas disebabkan karena spermatozoa yang tidak motil tetapi sebenarnya masih hidup, sedangkan spermatozoa motil sudah pasti hidup. Menurut Gundogan *et al.* (2010), penurunan viabilitas karena

kerusakan spermatozoa diawali dengan hilangnya motilitas, terganggunya aktivitas metabolisme sel, rusaknya membran plasma, dan terakhir viabilitas spermatozoa yang rendah, sehingga penurunan viabilitas spermatozoa merupakan efek terakhir dari kerusakan spermatozoa. Spermatozoa yang mati akan menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa. Berdasarkan kriteria kualitas semen untuk inseminasi buatan maka semen dalam berbagai modifikasi pengencer dalam penelitian ini layak digunakan untuk inseminasi buatan karena viabilitas Spermatozoa dari berbagai modifikasi pengencer dengan lama penyimpanan 4 hari lebih dari 45%. Apriliana *et al.* (2021) mengatakan semen yang layak digunakan untuk IB bila viabilitasnya di atas 45%.

3.4. Abnormalitas Spermatozoa Babi dalam Berbagai Modifikasi pengencer yang dipreservasi pada suhu 13 C selama 4 hari

Abnormalitas spermatozoa merupakan indikasi penurunan kesuburan karena mengurangi kapasitas spermatozoa pada saat fertilisasi dan mempengaruhi perkembangan dan pemeliharaan kebuntingan (Banaszewska dan Andraszek, 2021). Abnormalitas spermatozoa pada semen babi yang diamati, seperti ekor melipat atau melingkar, kepala putus, atau ekornya putus dan kepala membesar. Rata-rata dan simpangan baku persentase abnormalitas spermatozoa babi dalam berbagai modifikasi pengencer terlihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Persentase Abnormalitas Spermatozoa babi dalam Berbagai Modifikasi Pengencer yang di dipreservasi Pada Suhu 13°C Selama 4 hari.

Perlakuan	Abnormalitas spermatozoa selama penyimpanan (%)				Rata-Rata-
	Hari 1	Hari 2	Hari 3	Hari4	
(BTS+KT5%+EM0,01%)	4.50 ±.577bA	8.75±.957bB	9.50±.577bC	10.50±1.291bD	8.31 ±2.496
(BTS+EM0,01%)	4.75±.957bA	8.25 ±.957bB	10.00 ±.816bC	12.50 ±.577bD	8.88 ±3.008
(TCF+KT5%+EM0,01%)	4.00±.816aA	6.75 ±.500aB	8.00±.816aC	9.75±.957aD	7.13±2.277
(TCF+EM0,01%)	4.25 ±.500bA	8.50±.577bB	10.25 ±.957bC	11.25 ±.957bD	8.56 ±2.851

Keterangan: Superskrip huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$). Superskrip huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p<0,05$)

Berdasarkan **Tabel 4** diketahui lama penyimpanan berpengaruh sangat nyata ($P<0,05$) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa babi dalam berbagai modifikasi pengencer yang disimpan selama 4 hari pada suhu 13°C. Rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa terendah pada hari pertama dan tertinggi pada hari ke-4.

Persentase abnormalitas terendah hari keempat pada modifikasi pengencer TCF+KT5%+EM0,01% (9,75%) diikuti BTS+KT5%+EM0,01% (10,59%), TCF+EM0,01% (11,25%) dan tertinggi yaitu BTS + EM0,01% (12,50%). Semakin rendah persentase abnormalitas maka kualitas semen akan semakin baik. Walaupun terjadi peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa babi sampai hari keempat, namun pengencer ini masih layak digunakan untuk IB karena abnormalitas spermatozoa masih dibawah 20%. Hal ini sesuai pernyataan Shipley dan Act (1999) bahwa jumlah morfologi abnormal spermatozoa babi tidak melebihi 25% untuk perkawinan alami dan kurang dari 20% untuk inseminasi buatan. Lebih lanjut Waberski *et al.* (2019) menyatakan selama proses penyimpanan spermatozoa mengalami proses penuaan secara alami sehingga berpengaruh terhadap struktur dan fungsi spermatozoa seperti membran plasma yang rusak menyebabkan meningkatnya morfologi spermatozoa abnormal dan kematian sel spermatozoa. Pinart *et al.* (2022) menyatakan bahwa semakin lama penyimpanan akan menyebabkan kerusakan membran plasma spermatozoa dan spermatozoa abnormal meningkat sehingga suasana spermatozoa menjadi tidak isotonik yang berdampak pada kematian spermatozoa.

Penyimpanan diikuti dengan penurunan suhu menyebabkan meningkatnya persentase abnormalitas spermatozoa. Hafez (2008) menyatakan lama penyimpanan dengan diikuti penurunan suhu secara cepat akan meningkatkan persentase abnormalitas spermatozoa. Selanjutnya Szymanowicz *et al.* (2019) melaporkan semakin lama waktu penyimpanan maka semakin tinggi persentase abnormalitas yang disebabkan oleh stres dingin dan ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama penyimpanan

Analisis ragam menunjukkan rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa terendah pada kombinasi pengencer TCF+KT5%+EM0,01% yaitu 7,13% berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan ketiga pengencer lainnya yaitu BTS+KT5%+EM0,01% (8,31%), BTS+EM0,01% (8,88%) dan TCF+EM0,01% (8,56%). Spermatozoa babi dalam modifikasi pengencer Tris citrate fruktosa yang disuplementasi 5% kuning telur dan ekstrak *Borassus flabellifer* Linn 0,01% memiliki angka abnormalitas yang rendah dibanding spermatozoa dalam tiga pengencer lainnya. Rendahnya abnormalitas spermatozoa pada pengencer TCF+5%KT+EM0,01% karena pengencer ini mengandung komposisi nutrisi dan bahan penyangga yang lengkap untuk spermatozoa babi.

Tris aminomethane berperan sebagai penyangga untuk mempertahankan pH, tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit yang optimal bagi spermatozoa serta memiliki toksisitas yang rendah (Namula *et al.*, 2019) Kuning telur melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold Shock*). Putri *et al.* (2021) menyebutkan bahwa penambahan kuning telur pada pengencer tris aminomethane diperlukan karena didalam kuning telur mengandung lipoprotein dan lesitin yang melindungi integritas sel sperma dari *cold shock* serta berfungsi untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa dan sebagai buffer (penyangga) dari perubahan pH bahan pengencer.

Penambahan ekstrak mesocarp *Borassus flabellifer* Linn 0,01% yang mengandung antioksidan β -karoten dapat mempertahankan kualitas semen dengan cara menetralkan reaktif oksigen spesies (ROS). ROS terbentuk dari proses peroksidasi lipid pada spermatozoa sehingga membran plasma dan akrosom spermatozoa rusak dan menyebabkan terjadinya perubahan fungsi membran yang berakibat terhadap penurunan metabolisme sperma, morfologi sperma, motilitas sperma dan fertilitas. Proses peroksidasi merubah struktur spermatozoa, terutama pada bagian membran dan akrosom, kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat dan pelepasan komponen intraseluler, keadaan ini dapat dicegah dengan menambahkan antioksidan ke dalam pengencer semen (Feradis, 2009).

4. Kesimpulan

Modifikasi pengencer dari keempat perlakuan dapat mempertahankan kualitas spermatozoa babi yang disimpan pada suhu 13°C hingga hari keempat. Modifikasi pengencer TCF+kuning telur5%+ekstrak mesocarp 0.01% memberikan hasil terbaik dalam mempertahankan kualitas semen dengan persentase motilitas dan viabilitas tertinggi dan persentase abnormalitas terendah dibandingkan ketiga pengencer lainnya. Walaupun demikian, semua kelompok modifikasi pengencer BTS dan TCF dengan suplementasi kuning telur dan ekstrak mesocarp dalam penelitian ini mampu mempertahankan motilitas > 40%, viabilitas >45% dan abnormalitas < 20% sehingga layak dipakai dalam prosedur IB.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih Penulis sampaikan kepada P3M Politeknik Pertanian Negeri Kupang yang telah membiayai penelitian ini melalui DIPA Politani Kupang Tahun 2022. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Deni Tabun (Mitra/produsen semen babi), Bapak Yonas Lino. Nathan Adoe, Marthen Bire dan Ibu Mei Ryske Lusie (PLP/Teknisi Laboratorium Anatomi Patologi), serta mahasiswa/i Prodi DIII Kesehatan Hewan Politani Kupang: (Aryo, Kelvin, Ricad, Angga, Manase, Jeri, Ari, Adam, Selvi dan Tasya) yang telah mendukung selama penelitian ini berlangsung.

Daftar Pustaka

- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Eosin-Nigrosin Staining Procedure. In A. Agarwal, S. Gupta, & R. Sharma (Eds.), *Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide* (pp. 73–77). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_8
- Annisa Fithri Lubis, & R Iis Arifiantini, W. N. B. A. (2014). Pengujian Babi Menggunakan Morfologi Spermatozoa Pada Berbagai Breed Pewarnaan Eosin-Nigrosin dan Carbofluchsin. In Komang Budaarsa Ida Bagus Komang Ardana N. Sadra Dharmawan I Wayan Suarna I Gede Mahardika N. N. Suryani I N. Tirta Ariana A. A. A. Sri Trisnadew (Ed.), *Seminar dan Lokakarya Nasional Ternak Babi : Peran Peternakan Babi dalam Konstelasi Penyedia Pangan Nasional* (pp. 249–259). Fakultas Peternakan Universitas Udayana.
- Apriliana, K. S., Bebas, W., dan Trilaksana, I. G. N. B. (2021). Mempertahankan Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Babi dalam Pengencer Air Kelapa Kuning Telur Bebek dengan Pengimbuhan Sari Wortel. *Indonesia Medicus Veterinus*, 10(3), 409–419. <https://doi.org/10.19087/imv.2021.10.3.409>
- Ax R.L., D. M. R. , D. B. A. , Lenz R. W., L. C. C., V. D. D., H. B. and B. M. E. (2008). Semen Evaluation. In Edited by Hafez and Hafez. (Ed.), *Reproductive in Farm Animals*. (8th Edition., pp. 365-375.). Lea and Febiger
- Banaszewska, D., & Andraszek, K. (2021). Assessment of the morphometry of heads of normal sperm and sperm with the Dag defect in the semen of Duroc boars. *J Vet Res*, 65, 239–244. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0019>
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary Medicine International*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2011/686137>
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 621–628. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>
- Baumber, J., Ball, B., Gravance, C., MEDINA, V., & Morel, M. (2000). The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation.

- Journal of Andrology*, 21, 895–902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
- Bebas, W., Larastiyani Buyona, G., & Budiasa, K. (2016). *Penambahan Vitamin E Pada Pengencer BTS ® Terhadap Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Babi Landrace Pada Penyimpanan 15 ° C*. Buletin Veteriner Udayana. Buletin Veteriner Udayana. Vol 8(1):1-7
- Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Hinrichs, K., & Hartman, D. L. (2011). CHAPTER 13 - Examination of the Stallion for Breeding Soundness. In S. P. Brinsko, T. L. Blanchard, D. D. Varner, J. Schumacher, C. C. Love, K. Hinrichs, & D. L. Hartman (Eds.), *Manual of Equine Reproduction (Third Edition)* (pp. 176–206). Mosby. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06482-8.00022-3>
- Bustani, G. S., & Baiee, F. H. (2021). Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, 14(5), 1220–1233. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.1220-1233>
- Čeřovský, J., Frydrychová, S., Lustyková, A., & Rozkot, M. (2005). Lyczynski and Pawlak. In *Czech J. Anim. Sci* (Vol. 50, Issue 7).
- Chatterjee, S., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*, 60, 498–506. <https://doi.org/10.1002/mrd.1115>
- Dominiek, M., Alfonso, L. R., Tom, R., Philip, V., & Ann, V. S. (2011). Artificial Insemination in Pigs. In M. Manafi (Ed.), *Artificial Insemination in Farm Animals*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/16592>
- Dongkot, S., Marawali, A., Hine, T. M., & Nalley, W. M. (2022). Kualitas Semen Beku Babi Duroc Dalam Pengencer Tris Modifikasi Dengan Waktu Ekuilibrasi Yang Berbeda (the frozen sperm quality of duroc pig in modified tris diluent with different equilibration time). *Jurnal Nukleus Peternakan*, 9(1), 72–84. <https://doi.org/10.35508/nukleus.v9i1.5491>
- Eka Wahyudi, F., Susilawati, T., Nurul Isnaini, dan, Fakultas Peternakan, M., Brawijaya, U., & Fakultas Peternakan, D. (2016). Penggantian Bovine Serum Albumin Pada Cep-2 Dengan Serum Darah Sapi Terhadap Kualitas Semen Sapi Limousin Pada Suhu Penyimpanan 3-5 °C. In *J. Ternak Tropika* (Vol. 17, Issue 2).
- 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*, 08(03), 239–251. <https://doi.org/10.4236/ojas.2018.83018>
- Epriana Amtiran, D., Mata Hine, T., & Uly, K. (2020). Pengaruh Penambahan Vitamin E dalam Pengencer Tris-Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Babi Duroc (Effect of addition of vitamin e in tris-egg yolk on sperm quality of duroc pig). *Jurnal Peternakan Lahan Kering*, 2(4), 1111–1118.
- Feradis. (2009). *Peranan Antioksidan Dalam Pembekuan Semen Feradis* (Vol. 6, Issue 2). <https://www.neliti.com/id/publications/126867/peranan-antioksidan-dalam-pembekuan-semen>
- Frunză, I., Cernescu, H., & Korodi, G. (2008). Physical and Chemical Parameters of Boar Sperm. *Foodbalt, XLI*(119), 634–640.
- G Sumardani, N. L., Tuty, L. Y., Siagian, P. H., Klinik, D., dan Patologi, R., Kedokteran Hewan, F., & Pertanian Bogor, I. (2008). *Viabilitas Spermatozoa Babi dalam*

- Pengencer BTS (Beltsville Thawing Solution) yang Dimodifikasi pada Penyimpanan Berbeda The Boar Sperm Viability in Modified BTS (Beltsville Thawing Solution) in Different Storage.*
- Gadea, J. (2003). Review : Semen Extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17–27.
- Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F., & Fidan, A. F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122(3), 200–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.012>
- Hafez, E. S. E. (2008). *Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos. Reproductive in Farm Animals* (Hafez and Hafez, Ed.; 8th ed.). Lea and Febiger.
- Idayati, E., Suparmo, S., & Darmadji, P. (2014). Potensi senyawa bioaktif mesocarp buah lontar (*Borassus flabelifer* L.) Sebagai sumber antioksidan alami. *Jurnal Agritech*, 34(03), 277.
- Johnson, L. A., Weitze, K. F., Fiser, P., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 143–172. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-3)
- Knox, R. v. (2016). Artificial Insemination In Pigs Today. *Theriogenology*, 85(1), 83–93. <https://doi.org/10.1016/J.Theriogenology.2015.07.009>
- Kondracki, S., Iwanina, M., Wysokińska, A., & Huszno, M. (2012). Comparative analysis of Duroc and Pietrain boar sperm morphology. *Acta Veterinaria Brno*, 81(2), 195–199. <https://doi.org/10.2754/avb201281020195>
- Luh, N., Sumardani, G., Ketut, D., Putra, H., Budaarsa, K., Arifiantini, R. I., Nyoman, G., Bidura, G., & Mahardika, G. (2021). Sperm morphological assessments of Bali boar semen collected from three area in Bali Island, Indonesia. ~ 54 ~ *International Journal of Fauna and Biological Studies*, 8(2), 54–57. www.fauajournal.com
- Malo Bulu, P., Studi Kesehatan Hewan, P., Peternakan, J., & Pertanian Negeri Kupang Jl Herman Yohanes, P. (n.d.). 1828 PARTNER, TAHUN 27 NOMOR 1.
- Martins, V. E. D., Pinto, S. C. C., Chaves, R. M., Filho, A. K. D. B., Laskoski, L. M., & Souza, F. A. (2020). Antioxidant effect on viability of boar semen cooled to 15°C. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 72(1), 145–152. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-11294>
- Molla Tanga, B., Qamar, A. Y., Raza, S., Bang, S., Fang, X., Yoon, K., & Cho, J. (2021). Semen evaluation: methodological advancements in sperm quality-specific fertility assessment-A review. 00(00), 1–18. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0072>
- Muvhali, P. T., Bonato, M., Malecki, I. A., & Cloete, S. W. P. (2022). Mass Sperm Motility Is Correlated to Sperm Motility as Measured by Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) Technology in Farmed Ostriches. *Animals*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091104>
- Namula, Z., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirata, M., Nguyen, N. T., Hirano, T., Le, Q. A., Nii, M., & Otoi, T. (2019). Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane on the quality of frozen-thawed boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(1), 106–114. <https://doi.org/10.1556/004.2019.012>
- Ochsendorf, F. R. (1998). Infection and reactive oxygen species. *Andrologia*, 30(S1), 81–86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1998.tb02830.x>
- Parera, H., Ndoen, B., Lenda, V., Mirandy Pratama Sirat, M., & Negeri Kupang Jl Herman Yohanes Lasiana Kupang, P. D. (2019). Effectiveness of *Borassus*

- flabellifer Mesocarp Extract in Beltsville Thawing Solution Diluents on Spermatozoa Viability from Swine Cauda Epididymis. *Maret*, 7(1), 212–216.
- Pinart, E., Cenariu, M., Risopatrón, J., & Waberski, D. (n.d.). *Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status*.
- Pryor, W. A., Stahl, W., & Rock, C. L. (2000). Beta Carotene: from Biochemistry to Clinical Trials. *Nutrition Reviews*, 58(2), 39–53. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2000.tb07810.x>
- Putri, F., Santoso, H., & Latconsina, H. (2021). Pengaruh Pengencer Tris Kuning Telur dan Andromed Terhadap Motilitas Spermatozoa Semen Sapi Friesian Holstein (*Bos taurus*) Sebelum dan Sesudah Pembekuan. *Jurnal SAINS ALAMI (Known Nature)*, 3. <https://doi.org/10.33474/j.sa.v3i2.10409>
- Radomil, L., Pettitt, M. J., Merkies, K. M., Hickey, K. D., & Buhr, M. M. (2011). Stress and dietary factors modify boar sperm for processing. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(SUPPL. 2), 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01865.x>
- Ratnawati, D., Isnaini, N., & Susilawati, T. (2017). Pemanfaatan casa dalam observasi motilitas spermatozoa semen cair Sapi Madura dalam pengencer berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 27(1), 80–95. <https://doi.org/10.21776/ub.jiip.2017.027.01.07>
- Shipley, C. F., & Act, D. (1999). Breeding soundness examination of the boar PRODUCTION TOOL. In *Swine Health and Production* (Vol. 7, Issue 3). <http://www.aasp.org/shap.html>
- Stradivari, M. P. F., Sumardani, N. L. G., & Mariani, N. P. (2019). *Prosesing Semen Babi Di Unit Pelaksana Teknis (Upt) Balai Inseminasi Buatan Daerah Provinsi Bali*. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/tropika/article/download/47298/28395>
- Szymanowicz, J., Schwarz, T., Murawski, M., Małopolska, M., Oszczeda, Z., Tuz, R., Nowicki, J., & Bartlewski, P. M. (2019). Storage of boar semen at 16–18 °C in the long-term commercial extender prepared with deionized water or nanowater. *Animal Reproduction*, 16(4), 864–870. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0023>
- Tamoes, J. A., Nalley, W. M., & Hine, D. T. M. (2014). Fertilitas Spermatozoa Babi Landrace dalam Pengencer Modifikasi Zorlesco dengan Susu Kacang Kedelai. *Maret*, 12(1), 20–30. <https://jurnal.uns.ac.id/Sains-Peternakan/article/view/4772/4118>
- Tarig, A. A., Wahid, H., Rosnina, Y., Yimer, N., Goh, Y. M., Baiee, F. H., Khumran, A. M., Salman, H., & Ebrahimi, M. (2017). Effect of different concentrations of egg yolk and virgin coconut oil in Tris-based extenders on chilled and frozen-thawed bull semen. *Animal Reproduction Science*, 182, 21–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.024>
- Taufiqurrachman. (2012). The effect of Oxygen free Radicals on Human Sperm Function and Aging. In Perhimpunan Andrologi Indonesia (PANDI) Perhimpunan Dokter Spesialis Andrologi Indonesia (PERSANDI) (Ed.), *life extension strategies and recent reproductive health issues* (pp. 55–56). FK Universitas Sebelas Maret.
- Tethool, A. N., Ciptadi, G., Wahjuningsih, S., & Susilawati, T. (2022). Karakteristik dan Jenis Pengencer Semen Sapi Bali: Suatu Review. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*, 12(1). <https://doi.org/10.46549/jipvet.v12i1.214>

- Tsujii, H., Ohta, E., Miah, A. G., Hossain, S., & Salma, U. (2006). Effect of fructose on motility, acrosome reaction and in vitro fertilization capability of boar spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, 5(4), 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2006.00150.x>
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F., & Johnson, L. (2019). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, 2–7. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.05.030>
- Wang, P., Wang, Y.-F., Wang, C.-W., Bu, S.-H., Hu, J.-H., Li, Q.-W., Pang, W., & Yang, G. (2012). Effects of low-density lipoproteins extracted from different avian yolks on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. *Zygote (Cambridge, England)*, 22, 1–7. <https://doi.org/10.1017/S096719941200041X>
- Yusuf, T., Arifiantini, R., Dapawole, R., & Nalley, W. (2017). Kualitas Semen Beku Babi dalam Pengencer Komersial yang Disuplementasi dengan Trehalosa. *Jurnal Veteriner*, 18(1), 69–75. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2017.18.1.69>
- Zhou, J., Chen, L., Li, J., Li, H., Hong, Z., Xie, M., Chen, S., Yao, B., & Drevet, J. R. (2015). The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132974>