

The Effect of Additional Tomato Extract in Diluting Sodium Citrate and Egg Yellow in Kampung Chicken on The Quality of Semen Cow Limousine

Dian Fatihani Situmorang^{1*}, Efrida Pima Sari Tambunan¹, & Syukriah¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara, Medan, Indonesia;

Article History

Received : November 13th, 2023

Revised : December 02th, 2023

Accepted : January 10th, 2024

*Corresponding Author:

Dian Fatihani Situmorang,

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara, Medan, Indonesia;

Email:

dianfatihanisitumorang@gmail.com

Abstract: Undiluted sperm will reduce fertility, therefore dilution is performed to maintain the quality of spermatozoa during storage. Tomatoes contain carbohydrates, vitamin A, vitamin C, protein, and lycopene as antioxidants. Carbohydrates and antioxidants act as a source of energy to potentially prevent free radicals that can damage cells. This study aims to determine the effect of adding tomato juice in sodium citrate diluent and free-range chicken egg yolks to the semen quality of limousin cattle. This study used a completely randomized design (CRD) with 4 treatments and 5 replications. The treatment consisted of a solution of sodium citrate and egg yolk (P0), sodium citrate and egg yolk + 10% tomato extract (P1), sodium citrate and egg yolk + 20% tomato extract (P2), and egg yolk sodium citrate + 30% tomato extract. % (P3). Parameters observed were motility, viability and abnormalities of semen spermatozoa of Limousin cattle. Observations were made at 0, 24, 48, and 72 hours after cooling. The results showed that the addition of 10% tomato extract (P1) had a significant effect on the highest percentage of motility, namely $42.00 \pm 2.73c$ for the 48th hour, the highest viability $62.10 \pm 4.51c$ for the 72nd hour, and lowest abnormality $16.60 \pm 1.81a$ until the 72nd hour. The addition of 10% tomato extract (P1) in sodium citrate diluent and egg yolk resulted in the best motility, viability, and abnormality percentage of Limousin cattle spermatozoa.

Keywords: Limousine cattle, motility, sodium citrate and egg yolk, tomato juice, viability and abnormalities of spermatozoa.

Pendahuluan

Bioteknologi reproduksi sampai sekarang ini mengalami peningkatan yang sangat pesat. Salah satu bioteknologi reproduksi yang cepat berkembang adalah Inseminasi Buatan (IB). Inseminasi Buatan (IB) atau kawin suntik adalah suatu cara memasukkan spermatozoa yang telah diencerkan terlebih dahulu ke dalam saluran alat kelamin betina. Metode perkawinan IB dapat meningkatkan penggunaan semen pejantan karena dapat untuk mengawini banyak betina. Secara umum, IB berfungsi untuk: (1) Meningkatkan kualitas genetik, (2) Mencegah penyakit menular, (3) Membuat catatan yang lebih akurat, (4) Mengurangi biaya, dan (5) Mencegah kecelakaan yang disebabkan oleh pejantan (Kusumawati, 2017). Tingkat

keberhasilan inseminasi buatan sangat dipengaruhi oleh kualitas sperma.

Kualitas semen umumnya ditentukan berdasarkan daya gerak (motilitas), daya hidup (viabilitas) dan abnormalitas baik pada semen segar, setelah diencerkan maupun setelah dibekukan. Sperma yang tidak diencerkan dan disimpan selama beberapa hari akan menurunkan fertilitas. Cara yang digunakan untuk mempertahankan kualitas sperma tetap bagus dan dapat disimpan dalam waktu yang lama yaitu melalui pengenceran semen (Ihsan, 2011). Pengencer dapat meningkatkan volume semen, sehingga memungkinkan untuk melakukan inseminasi buatan pada sapi betina dalam jumlah yang lebih besar daripada hanya satu kali ejakulasi. Pengencer yang baik adalah harganya murah, sederhana, dan praktis proses

pembuatannya, dan memiliki daya preservasi tinggi (Manehat *et al.*, 2021). Pengencer harus mengandung zat gizi sebagai sumber energi spermatozoa selama penyimpanan, memiliki daya preservasi tinggi yang mampu melindungi spermatozoa dari *Cold Shock*, mengandung unsur-unsur yang sifat fisik dan kimiawinya hampir sama dengan semen, tidak bersifat racun bagi spermatozoa dan sistem reproduksi betina, harus memungkinkan spermatozoa bergerak secara bertahap, menghambat pertumbuhan bakteri, sebagai penyangga (*buffer*), mudah pembuatannya, dan harganya terjangkau (Susilawati, 2011).

Pengencer yang digunakan oleh UPT Inseminasi Buatan Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan Provinsi Sumatera Utara dalam pengenceran semen adalah bahan pengencer pabrikan termasuk Andromed dan Bovifree yang harganya relatif mahal. Permasalahan utama dalam pembuatan pengencer adalah mahalnya pengencer pabrikan. Mengingat hal tersebut, maka perlu dicari alternatif lain sebagai bahan pengencer, seperti dengan memanfaatkan natrium sitrat, kuning telur, sari buah dan bahan-bahan alami lainnya. Natrium sitrat dan kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein yang dapat digunakan sebagai penyangga (*buffer*) semen dan mencegah *cold shock* akibat penurunan suhu secara mendadak (Trias, 2001; Mustaqilla *et al.*, 2020). Kuning telur juga mengandung glukosa yang digunakan sebagai sumber energi bagi spermatozoa.

Natrium sitrat dan kuning telur terdapat *buffer* yang dapat menjaga dan mengatur pH. Sistem *buffer* berperan dalam melindungi spermatozoa dari perubahan pH secara mendadak yang dapat merusak viabilitas spermatozoa (Junianto *et al.*, 2000; Mustaqilla *et al.*, 2020). Kuning telur ayam kampung mengandung energi sebanyak 150 kalori, 13 gram protein, 10 gram lemak, dan 1,5 gram karbohidrat (Zein dan Emir, 2019). Berdasarkan kandungan tersebut, kuning telur ayam kampung dapat satu bahan pengencer pada semen sapi. Buah-buahan lain yang digunakan sebagai bahan pengencer alternatif semen yaitu tomat (*Solanum lycopersicum* Mill). Buah tomat mengandung banyak nutrisi seperti karbohidrat, vitamin A, vitamin C, protein, dan Likopen sebagai antioksidan. Kandungan karbohidrat dan antioksidan dapat berperan sebagai sumber energi berpotensi mencegah radikal bebas yang

dapat merusak sel.

Ketersediaan buah tomat relatif mudah diperoleh dan harganya murah, dan menjadi keunggulan sehingga dapat diprioritaskan untuk penelitian. Sari tomat juga mempunyai kandungan nutrisi yang sangat tinggi dalam mempertahankan kualitas spermatozoa pada penyimpanan suhu ruang (Noviyandi *et al.*, 2019). Metabolisme spermatozoa selama penyimpanan akan menghasilkan radikal bebas yang memiliki efek merusak asam lemak tak jenuh pada membran spermatozoa sehingga mempengaruhi motilitas dan viabilitas spermatozoa (Putra *et al.*, 2019). Berdasarkan hal tersebut, maka penulis melakukan penelitian tentang Pengaruh Penambahan Sari Tomat dalam Pengencer Natrium Sitrat dan Kuning Telur Ayam Kampung Terhadap Kualitas Semen Sapi Limousin di Balai Inseminasi Buatan Daerah Provinsi Sumatera Utara.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium UPT Balai Inseminasi Buatan (IB) Dinas Ketahanan Pangan dan Peternakan Provinsi Sumatera Utara yang berada di Jl. Jendral Gatot Subroto km. 7, Kota Medan pada bulan September-Oktober 2022.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat vagina buatan (AVB), *waterbath*, mikroskop, timbangan mikro, *Handly Counter*, *transferpette*, spektrofotometer, pemisah kuning telur, gelas benda, gelas penutup, *juicer*, tabung sentrifuse, pot sampel, *erlenmeyer*, pipet tetes, pisau, dan gelas ukur. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1 ekor sapi Limousin yang berumur 4 tahun dan memiliki bobot badan 562 kg, buah tomat, kuning telur ayam kampung, natrium sitrat, air hangat ($\pm 37-40^{\circ}\text{C}$), larutan fisiologis NaCl 0,9%, vaselin, pewarna *eosin-negrosin*, *Streptomycin* dan *Penicillin* sebagai antibiotik, aquadest, kertas saring, tissue, dan kertas lakmus.

Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 5 ulangan. Setiap ulangan akan diamati selama 0

jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam dan disimpan dilemari pendingin dengan suhu 4°C. Dengan rancangan sebagai berikut; P₀: 80% Larutan Natrium Sitrat + 20% Kuning Telur Ayam Kampung + 0,5 ml *Penicilin* dan 1 ml *Streptomycin*, P₁: 10% Sari Tomat + 70% Larutan Natrium Sitrat + 20% Kuning Telur Ayam Kampung + 0,5 ml *Penicilin* dan 1 ml *Streptomycin*, P₂: 20% Sari Tomat + 60% Larutan Natrium Sitrat + 20% Kuning Telur Ayam Kampung + 0,5 ml *Penicilin* dan 1 ml *Streptomycin*, P₃: 30% Sari Tomat + 50% Larutan Natrium Sitrat + 20% Kuning Telur Ayam Kampung + 0,5 ml *Penicilin* dan 1 ml *Streptomycin*.

Analisis data

Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan *Analisis of Variance* (ANOVA) pola satu arah (*one way*) menggunakan aplikasi SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*). Apabila hasil yang diperoleh dari uji Anova menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) maka akan dilanjutkan dengan uji Duncan.

Hasil dan Pembahasan

Evaluasi semen segar Sapi Limousin

Ketentuan dasar dalam menentukan semen segar yang layak untuk dijadikan sampel dapat diketahui dari hasil evaluasi semen segar. Evaluasi semen segar sapi Limousin pada penelitian ini diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Uji makroskopis merupakan pemeriksaan semen secara langsung, pemeriksaan ini terdiri dari volume, pH, warna, dan konsistensi, sedangkan uji mikroskopis merupakan pengamatan yang menggunakan mikroskop. Pengamatan ini terdiri dari gerak massa, gerak individu, motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi spermatozoa.

Tabel 1. Karakteristik Semen Segar Sapi Limousin

Karakteristik	Rataan
Umur	4 Tahun
Uji Makroskopis	
Volume (ml)	5
pH	6-7
Warna	Putih Susu
Konsistensi	Sedang
Uji Mikroskopis	

Gerak Massa	++
Gerak Individu	2
Motilitas (%)	53%
Viabilitas (%)	91,6%
Abnormalitas (%)	5,2%
Konsentrasi (sel sperma/ml)	1.038,6 x 10 ⁹ juta/ml

Sumber: Hasil Penelitian

Hasil evaluasi semen segar pada tabel diatas diketahui bahwa sampel yang digunakan untuk penelitian termasuk dalam kategori normal. Pada penelitian ini volume semen sapi Limousin berada pada kisaran normal. Rata-rata volume semen sapi Limousin dari 5 ejakulasi adalah 5 ml (Tabel 1). Hasil ini tidak jauh berbeda dengan pendapat Toelihere, (1981) yang menyatakan bahwa sapi menghasilkan volume yang bervariasi antara 1,0 sampai 15,0 ml. Derajat keasaman (pH) semen sapi Limousin yang diperoleh pada penelitian ini adalah 6-7. Hasil ini hampir sama dengan pH semen sapi Limousin yang diperoleh Yahaq, dkk, (2019) yaitu 6,67. Hasil tersebut tergolong dalam keadaan normal karena berada di antara 6,4 dan 7,8 (Garner dan Hafez, 2000). Toelihere (1993), menyatakan bahwa pH semen dipengaruhi oleh metabolisme fruktosa plasma seminalis dan menghasilkan asam laktat dalam jumlah tinggi.

Warna semen yang diperoleh adalah berwarna putih susu. Hasil ini didukung oleh pendapat Kusumawati *et al.*, (2018) dan Hamdana *et al.*, (2019) menyatakan bahwa warna semen segar sapi Limousin adalah berwarna putih susu. Warna dipengaruhi oleh pigmen *riboflavin* yang dibawa oleh satu gen autosomal resesif, yang diproduksi oleh kelenjar accessories (Hafez, 2000). Konsistensi atau derajat kekentalan semen yang diperoleh pada sapi Limousin ini berada pada konsistensi sedang. Konsistensi sedang pada semen segar bangsa Limousin tergolong normal. Hal ini didukung hasil penelitian Hamdana *et al.*, (2019) dan Suhartati *et al.*, (2020) bahwa konsistensi semen sapi Limousin adalah sedang.

Gerak massa hasil pemeriksaan yang diperoleh dalam penelitian ini adalah positif dua (++) . Hasil ini sejalan dengan gerak massa semen sapi Limousin yang diperoleh Yahaq, dkk, (2019) yaitu (++) . Gerak individu dari penelitian ini diperoleh hasil yang baik dengan angka penilaian 2 yaitu bergerak progresif,

namun tidak ada gelombang. Hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere, (1993) menyatakan bahwa penilaian kualitas semen yang ke 2 cukup baik artinya gerakan berayun atau melingkar, kurang dari 50% bergerak progresif, tidak ada gelombang. Motilitas semen segar dalam penelitian ini didapatkan sebesar 53%. Hasil tersebut masih tergolong baik sesuai dengan yang dilaporkan oleh Garner dan Hafez, (2000) bahwa pada sapi tropis memiliki motilitas spermatozoa berkisar antara 40-75%. Viabilitas semen segar sapi Limousin dalam penelitian ini yaitu 91,6%.

Hasil presentase viabilitas semen segar ini termasuk dalam kategori yang baik dan didukung oleh pendapat Hafez, (2000) yang menyatakan bahwa semen segar yang akan diproses lebih lanjut harus mengandung setidaknya 80% spermatozoa hidup. Abnormalitas semen segar sapi Limousin dalam penelitian ini diperoleh sebesar 5,2%. Abnormalitas spermatozoa yang diperoleh tergolong dalam kategori sangat baik dimana, nilai tersebut sesuai dengan standar inseminasi buatan dan didukung oleh pendapat Kartasudjana, (2001) yang menyatakan bahwa semen untuk inseminasi buatan sebaiknya tidak boleh mengandung lebih dari 20% sperma abnormal. Konsentrasi spermatozoa sapi Limousin yang diperoleh adalah $1.038,6 \times 10^9$ juta/ml. Hasil ini sejalan dengan pendapat Alam *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa sapi jantan Limousin memiliki rata-rata konsentrasi lebih dari 1.004,9 juta/ml.

Pengaruh penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung terhadap motilitas semen Sapi Limousin

Motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa merupakan salah satu indikator dalam menentukan kualitas semen yang diencerkan dan juga dapat mempengaruhi daya fertilitas spermatozoa. Kecepatan gerak progresif spermatozoa untuk masing-masing spesies berbeda dan bervariasi tergantung pada kondisi media dan suhu lingkungan. Presentase motilitas diamati dari 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam pada saat semen yang diencerkan konstan pada suhu 4°C. Rata-rata persentase motilitas atau gerak spermatozoa sapi Limousin yang telah diamati setelah dilakukan pewarnaan

eosin negrosin pada kelompok perlakuan penambahan sari tomat dapat dilihat pada tabel 2. Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pola satu arah (*one way*) pada pengamatan motilitas menunjukkan taraf signifikan yaitu pada 0 jam (0,009), 24 jam (0,003), 48 jam (0,001), dan 72 jam (0,000), yang berarti bahwa penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung menunjukkan adanya pengaruh terhadap motilitas semen sapi Limousin ($P < 0,05$).

Tabel 2. Rata-rata (\pm SD) persentase motilitas spermatozoa (%) semen sapi Limousin dalam pengencer sari buah tomat pada berbagai perlakuan selama simpan dingin

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
P0	51,00 \pm 2,23 ^{bc}	43,00 \pm 2,73 ^a	38,00 \pm 2,73 ^b	31,00 \pm 2,23 ^c
P1	53,00 \pm 2,73 ^c	48,00 \pm 2,73 ^b	42,00 \pm 2,73 ^c	36,00 \pm 2,23 ^d
P2	48,00 \pm 2,73 ^{ab}	42,00 \pm 2,73 ^a	37,00 \pm 2,73 ^b	26,00 \pm 4,18 ^b
P3	47,00 \pm 2,73 ^a	41,00 \pm 2,23 ^a	33,00 \pm 2,73 ^a	22,00 \pm 2,73 ^a
P value	0,009	0,003	0,001	0,000

Keterangan: P0: natrium sitrat dan kuning telur, P1: sari tomat 10%, P2: sari tomat 20%, P3: sari tomat 30%. Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$).

Uji lanjut Duncan pada pengamatan motilitas spermatozoa di 0 jam menunjukkan bahwa P0 (51,00 \pm 2,23^{bc}) dan P2 (48,00 \pm 2,73^{ab}) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 (47,00 \pm 2,73^a) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 (53,00 \pm 2,73^c) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. Pengamatan motilitas spermatozoa di 24 jam menunjukkan bahwa antara P0 (43,00 \pm 2,73^a), P2 (42,00 \pm 2,73^a) dan P3 (41,00 \pm 2,23^a) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Namun, berbeda nyata dengan P1 yaitu (48,00 \pm 2,73^b). Pengamatan motilitas spermatozoa di 48 jam

P0, P2, dan P3 mengalami penurunan di bawah 40%. P0 ($38,00 \pm 2,73^b$) dengan P2 ($37,00 \pm 2,73^b$) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Namun, berbeda nyata dengan P3 yaitu ($33,00 \pm 2,73^a$). Sedangkan pada P1 ($42,00 \pm 2,73^c$) dengan P0 berbeda nyata. Pengamatan 72 jam terjadi penurunan dibawah 40% di setiap perlakuan terhadap motilitas spermatozoa. P0 ($31,00 \pm 2,23^c$), P1 ($36,00 \pm 2,23^d$), P2 $26,00 \pm 4,18^b$) dan P3 ($22,00 \pm 2,73^a$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata.

Berdasarkan hasil pengamatan dapat dilihat bahwa rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi Limousin selama proses pendinginan pada perlakuan yang berbeda mengalami penurunan. Hasil pengamatan pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam menunjukkan bahwa semen dalam bahan pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung dengan penambahan sari tomat sebanyak 10% (P1) adalah perlakuan yang paling baik dan masih menunjukkan persentase pergerakan progresif motilitas layak inseminasi buatan yaitu diatas 40% hingga penyimpanan jam ke-48. Hasil ini masih sesuai dengan ketentuan SNI 01.4869.1-2005 yang menyatakan bahwa kualitas semen setelah pembekuan atau pendinginan harus memiliki spermatozoa hidup dan motilitas progresif minimal 40%. Sebagaimana pendapat Toelihere, (1993) bahwa semen yang memenuhi syarat untuk digunakan dalam program inseminasi buatan harus memiliki persentase spermatozoa motil paling sedikit 40%.

Persentase motilitas spermatozoa berbanding terbalik dengan lama waktu penyimpanan dingin, dimana semakin lama waktu pendinginan maka semakin rendah persentase motilitas yang didapatkan. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh berkurangnya ketersediaan energi dalam bahan pengencer, semakin menuanya umur spermatozoa dan meningkatnya keasaman (pH) semen serta semakin meningkatnya jumlah spermatozoa yang rusak dan mati akibat pendinginan. Selain itu, ini juga dikarenakan oleh semen segar yang diperoleh pada saat penampungan menghasilkan rata-rata 53%, sehingga persentase motilitas pada saat penyimpanan dingin mengalami penurunan angka yang relatif rendah.

Hasil penelitian ini terbukti bahwa penambahan sari tomat 10% (P1) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung dapat memperbaiki komposisi dan

keadaan fisiologis pengencer, sebagaimana dapat dilihat dari persentase motilitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (P0). Tingginya persentase motilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan penambahan sari tomat 10% (P1) dibandingkan dengan kontrol kemungkinan disebabkan tingginya kadar vitamin C, vitamin E, dan likopen pada sari tomat yang berperan sebagai antioksidan. Seperti yang dilansir oleh Astuti, (2017) bahwa 1 kg tomat apel mengandung 142,1 mg vitamin C dan likopen sebanyak 66,72 mg. Adanya kandungan vitamin C, vitamin E, dan likopen ini dapat mengoptimalkan laju fruktolisis sehingga kebutuhan energi untuk motilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa dapat terpenuhi.

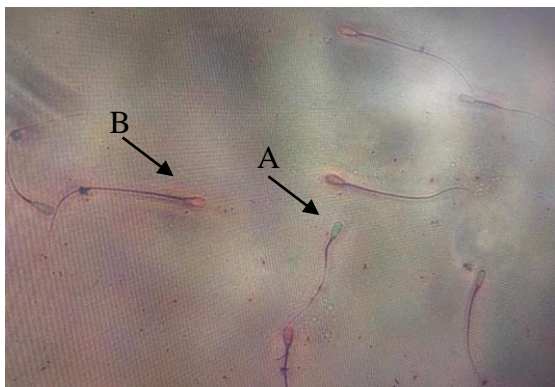
Kandungan vitamin C, vitamin E dan likopen merupakan antioksidan yang dapat mengikat radikal oksigen yang terdapat dalam sel untuk mencegah pembentukan peroksidasi lipid pada membran mitokondria yang dapat menghambat glikolisis dan motilitas. Hasil penelitian Chinoy *et al.*, (1991) dan Harbin *et al.*, (2017) menyatakan bahwa pemberian vitamin C yang dikombinasikan dengan vitamin E ternyata dapat meningkatkan kadar Na^+ dan K^+ dan aktivitas ATPase dan sukcinat dehidrogenase, sehingga terjadi peningkatan metabolisme energi pada spermatozoa kelinci. Hidrosinonemal (HNE) merupakan salah satu peroksidasi lipid yang berperan sebagai penghambat glikolisis dan motilitas spermatozoa. Penghambatan motilitas oleh HNE diyakini terkait dengan penghambatan glukolisis dan oksidasi gugus sulfhidril (-SH) dari protein mikrotubulus spermatozoa. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penambahan sari tomat 20% (P2) dan 30% (P3) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung ternyata menurunkan persentase motilitas spermatozoa pada sapi Limousin setelah simpan dingin.

Persentase motilitas spermatozoa pada kelompok penambahan sari tomat 20% (P2) dan 30% (P3) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol (P0). Rendahnya persentase motilitas spermatozoa pada kelompok penambahan sari tomat 20% (P2) dan 30% (P3) kemungkinan disebabkan oleh penurunan pH pengencer sehingga tidak sesuai lagi dengan keadaan fisiologis spermatozoa. Selain itu, hal ini juga disebabkan karena meningkatnya

kandungan yang terdapat dalam sari tomat seperti vitamin C dan likopen. Hal ini sesuai dengan pendapat Hammerstedt, (1993) yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi sari tomat, maka juga akan semakin tinggi kandungan vitamin C, vitamin E dan likopen dalam pengencer yang mempercepat laju fruktolisis dan akumulasi asam laktat dalam pengencer. Percepatan akumulasi asam laktat dalam pengencer akan semakin mempercepat penurunan pH semen yang selanjutnya akan menyebabkan penurunan aktivitas enzim metabolik, akibatnya kebutuhan energi untuk motilitas tidak dapat terpenuhi.

Pengaruh penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung terhadap viabilitas semen Sapi Limousin

Viabilitas atau daya hidup spermatozoa merupakan salah satu parameter penting untuk menentukan kualitas semen karena dapat mengetahui berapa persen spermatozoa yang hidup. Perbedaan spermatozoa yang hidup dan mati pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Viabilitas spermatozoa diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x. (A) Spermatozoa hidup, (B) Spermatozoa mati.

Lama waktu penyimpanan dingin semen cair berbanding lurus dengan jumlah spermatozoa yang mati. Semakin lama semen disimpan dalam suhu dingin, maka semakin banyak spermatozoa yang terlihat menyerap warna (mati) pada saat pengamatan. Rata-rata persentase viabilitas atau daya hidup spermatozoa sapi Limousin yang telah diamati setelah dilakukan pewarnaan eosin negrosin pada kelompok perlakuan penambahan sari

tomat dapat dilihat pada tabel 3. Berdasarkan hasil analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pola satu arah (*one way*) pada pengamatan motilitas menunjukkan taraf signifikan yaitu pada 0 jam (0,001), 24 jam (0,001), 48 jam (0,000), dan 72 jam (0,002), yang berarti bahwa penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung menunjukkan adanya pengaruh terhadap viabilitas semen sapi Limousin ($P < 0,05$). Uji lanjut Duncan pada pengamatan viabilitas spermatozoa di 0 jam menunjukkan bahwa P0 ($75,10 \pm 3,74^{bc}$) dan P2 ($71,50 \pm 5,20^{ab}$) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 ($66,50 \pm 4,54^a$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok

Tabel 3. Rata-rata (\pm SD) persentase viabilitas spermatozoa (%) semen sapi Limousin dalam pengencer sari buah tomat pada berbagai perlakuan selama simpan dingin

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
P0	$75,10 \pm 3,74^{bc}$	$71,20 \pm 4,50^{bc}$	$65,20 \pm 4,88^{bc}$	$56,80 \pm 5,17^{bc}$
P1	$80,90 \pm 3,92^c$	$76,00 \pm 4,33^c$	$70,50 \pm 4,44^c$	$62,10 \pm 4,51^c$
P2	$71,50 \pm 5,20^{ab}$	$65,90 \pm 5,28^{ab}$	$59,80 \pm 4,91^b$	$51,40 \pm 5,01^{ab}$
P3	$66,50 \pm 4,54^a$	$59,60 \pm 5,40^a$	$50,60 \pm 5,17^a$	$44,30 \pm 8,29^a$
P value	0,001	0,001	0,000	0,002

Keterangan: P0: natrium sitrat dan kuning telur, P1: sari tomat 10%, P2: sari tomat 20%, P3: sari tomat 30%. Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$).

P0 dengan P1 ($80,90 \pm 3,92^c$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. Pengamatan viabilitas spermatozoa di 24 jam menunjukkan bahwa P0 ($71,20 \pm 4,50^{bc}$) dan P2 ($65,90 \pm 5,28^{ab}$) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 ($59,60 \pm 5,40^a$) menunjukkan perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 ($76,00 \pm 4,33^c$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase.

Pengamatan di 48 jam terhadap viabilitas spermatozoa menunjukkan bahwa antara P0 ($65,20 \pm 4,88^{bc}$) dan P2 ($59,80 \pm 4,91^b$) tidak menunjukkan perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase.

P3 ($50,60 \pm 5,17^a$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 ($70,50 \pm 4,44^c$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. Pengamatan viabilitas spermatozoa di 72 jam menunjukkan bahwa antara P0 ($56,80 \pm 5,17^{bc}$) dan P2 ($51,40 \pm 5,01^{ab}$) tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 ($44,30 \pm 8,29^a$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 ($62,10 \pm 4,51^c$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase.

Berdasarkan hasil pengamatan terlihat bahwa rata-rata persentase viabilitas spermatozoa sapi Limousin selama proses pendinginan pada perlakuan yang berbeda mengalami penurunan. Hasil pengamatan pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam menunjukkan bahwa penambahan sari tomat sebanyak 10% (P1) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung adalah perlakuan yang paling baik yang masih menunjukkan persentase viabilitas tertinggi yaitu di atas 60% hingga jam ke-72 selama simpan dingin. Terdapat perbedaan antara nilai persentase viabilitas dan nilai persentase motilitas, sebagaimana diketahui bahwa persentase viabilitas relatif lebih tinggi dibandingkan dengan persentase motilitas spermatozoa. Hal ini diduga bahwa spermatozoa yang tidak bergerak progresif belum tentu mati, karena spermatozoa mengalami *cold shock* dan tidak mampu bergerak secara progresif. Hal ini juga didukung Riyadhi *et al.*, (2020) yang menyatakan bahwa spermatozoa yang motil selalu hidup, tapi spermatozoa hidup belum tentu motil.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan sari buah tomat dengan konsentrasi 10% (P1) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung dapat mempertahankan komposisi dan kondisi fisiologis pengencer, sehingga persentase hidup spermatozoa juga dapat dipertahankan. Hal ini dapat dilihat dari persentase viabilitas spermatozoa yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol (P0). Tingginya nilai persentase

viabilitas spermatozoa pada kelompok perlakuan penambahan sari tomat 10% (P1) dibandingkan dengan perlakuan kontrol (P0) dapat terjadi karena dalam sari tomat mengandung vitamin C, vitamin E, dan likopen yang berperan sebagai antioksidan. Dengan adanya vitamin C, vitamin E, dan likopen ini dapat mengoptimalkan laju fruktolisis sehingga kebutuhan energi untuk kelangsungan hidup spermatozoa dapat terpenuhi. Selain itu, kandungan vitamin C, vitamin E, dan likopen dapat mengikat radikal oksigen yang terdapat pada pengencer dan sel spermatozoa (Harbin *et al.*, 2017).

Vitamin C yang terkandung dalam sari tomat segera diubah menjadi radikal askorbil yang sangat reaktif terhadap radikal oksigen dan radikal hidroksil (Comb, 1992). Penambahan vitamin C sebanyak 200mg/100 ml pada pengencer dapat berperan sebagai pelindung membran plasma spermatozoa kambing peranakan Boer dari kerusakan akibat peroksidasi lipid (Harbin *et al.*, 2017). Selain itu, kuning telur juga mengandung sumber kolesterol berupa *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang mampu menjaga keutuhan membran plasma spermatozoa. LDL mempunyai efek stabilisasi plasma spermatozoa, membran integritas akrosom, mitokondria dan flagella spermatozoa (Meo *et al.*, 2022) Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penambahan sari tomat 20% (P2) dan 30% (P3) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung justru menurunkan persentase viabilitas spermatozoa sapi Limousin setelah simpan dingin.

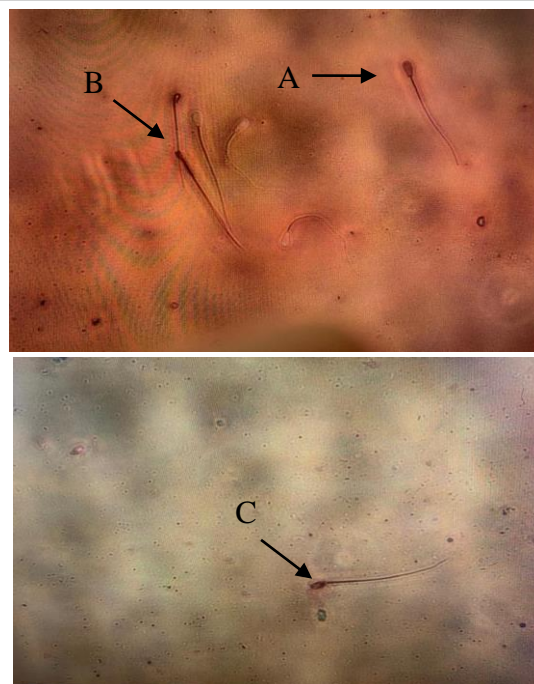
Persentase viabilitas pada kelompok penambahan sari tomat 20% (P2) dan 30% (P3) lebih rendah dibandingkan dengan pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung tanpa penambahan sari tomat (P0). Keadaan ini kemungkinan disebabkan karena semakin tingginya konsentrasi sari tomat juga akan meninggikan kandungan vitamin C nya dalam pengencer, sehingga akan mempercepat laju fruktolisis dan meningkatkan konsentrasi asam laktat dalam pengencer. Konsentrasi asam laktat yang tinggi dapat mengakibatkan penurunan pH semen secara cepat yang selanjutnya menyebabkan penurunan aktivitas enzim-enzim metabolisme, sehingga kebutuhan energi untuk mempertahankan hidup tidak dapat terpenuhi (Lehninger, 1993). Penyimpanan semen dalam

jangka waktu yang lama akan menyebabkan peningkatan akumulasi asam laktat sisa metabolisme sel, sehingga menyebabkan kondisi medium menjadi asam. Kondisi ini dapat menjadi racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa (Astuti, 2017).

Menurunnya pH, terjadi peningkatan konsentrasi H⁺ yang bereaksi dengan radikal membentuk hidrogen peroksida (Hammerstedt, 1993). Hidrogen peroksida merupakan katalis dalam pembentukan peroksidasi lipid yang dapat merusak membran plasma dan selanjutnya menghambat glikolisis dan tingkat kematian spermatozoa semakin meningkat. Dalam hal ini, Mukhlis *et al.*, (2017) juga menyatakan bahwa penurunan persentase viabilitas spermatozoa disebabkan oleh tingginya persentase campuran bahan pengencer. Penggunaan antioksidan yang berlebihan justru berubah menjadi pro-oksidan dan penggunaan antioksidan yang berlebihan akan bersifat racun bagi spermatozoa (Meo *et al.*, 2022).

Pengaruh penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung terhadap abnormalitas semen Sapi Limousin

Abnormalitas spermatozoa adalah kelainan atau tidak normalnya spermatozoa yang terbagi menjadi 3 macam yaitu abnormalitas primer, abnormalitas sekunder, dan abnormalitas tersier. Perbedaan spermatozoa yang hidup dan mati pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 2. Abnormalitas spermatozoa merupakan faktor penting dalam menentukan kualitas spermatozoa, karena jika persentase abnormalitasnya diatas 20% maka tingkat fertilitasnya rendah, sehingga berpengaruh pada tidak terjadinya fertilisasi pada saat kopulasi. Rata-rata nilai persentase abnormalitas spermatozoa sapi Limousin selama simpan dingin dapat dilihat pada tabel 4. Hasil analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pola satu arah (*one way*) pada pengamatan motilitas menunjukkan taraf signifikan yaitu pada 0 jam (0,011), 24 jam (0,001), 48 jam (0,004), dan 72 (0,000), yang berarti penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung menunjukkan adanya pengaruh terhadap abnormalitas semen sapi Limousin ($P < 0,05$).



Gambar 2. Abnormalitas spermatozoa diamati menggunakan mikroskop perbesaran 400x. (A) Spermatozoa normal, (B) Spermatozoa tanpa kepala, dan (C) Spermatozoa kepala kecil.

Tabel 4. Rata-rata (\pm SD) persentase abnormalitas spermatozoa (%) semen sapi Limousin dalam pengencer sari buah tomat pada berbagai perlakuan selama simpan dingin

Perlakuan	Waktu Pengamatan			
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
P0	6,90 \pm 0,96 ^{ab}	10,80 \pm 1,09 ^{ab}	14,30 \pm 2,01 ^{ab}	18,40 \pm 1,55 ^a
P1	6,10 \pm 0,54 ^a	9,20 \pm 1,25 ^a	12,50 \pm 2,71 ^a	16,60 \pm 1,81 ^a
P2	7,70 \pm 1,15 ^{bc}	12,20 \pm 1,20 ^{bc}	15,90 \pm 2,30 ^{bc}	21,00 \pm 1,83 ^b
P3	8,70 \pm 1,48 ^c	13,30 \pm 1,39 ^c	18,90 \pm 2,43 ^c	25,40 \pm 2,10 ^c
P value	0,011	0,001	0,004	0,000

Keterangan: P0: natrium sitrat dan kuning telur, P1: sari tomat 10%, P2: sari tomat 20%, P3: sari tomat 30%. Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata antar perlakuan ($P < 0,05$).

Uji lanjut Duncan pada pengamatan di 0 jam terhadap abnormalitas spermatozoa menunjukkan hasil bahwa P0 (6,90 \pm 0,96^{ab}) dan P2 (7,70 \pm 1,15^{bc}) tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 (8,70 \pm 1,48^c) menunjukkan

adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 ($6,10 \pm 0,54^a$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. Pengamatan abnormalitas spermatozoa di 24 jam menunjukkan bahwa P0 ($10,80 \pm 1,09^{ab}$) dan P2 ($12,20 \pm 1,20^{bc}$) tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 ($13,30 \pm 1,39^c$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 ($9,20 \pm 1,25^a$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase.

Pengamatan di 48 jam terhadap abnormalitas spermatozoa menunjukkan hasil bahwa P0 ($14,30 \pm 2,01^{ab}$) dan P2 ($15,90 \pm 2,30^{bc}$) tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P3 ($18,90 \pm 2,43^c$) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata dengan P0. Kelompok P0 dengan P1 ($12,50 \pm 2,71^a$) menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. Pengamatan di 72 jam menunjukkan bahwa terjadi peningkatan abnormalitas spermatozoa di atas 20% pada perlakuan P2 dan P3. Sebagaimana P0 ($18,40 \pm 1,55^a$) dan P1 ($16,60 \pm 1,81^a$) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata, namun ada perbedaan dari segi nilai persentase. P2 ($21,00 \pm 1,83^b$) dan P3 ($25,40 \pm 2,10^c$) menunjukkan perbedaan yang nyata dengan P0.

Hasil pengamatan pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam menunjukkan bahwa semen dalam bahan pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung dengan penambahan sari tomat sebanyak 10% (P1) menunjukkan persentase abnormalitas yang paling rendah hingga penyimpanan jam ke-72 sehingga layak untuk inseminasi buatan yaitu kurang dari 20%. Persentase abnormalitas spermatozoa ini berbanding terbalik dengan motilitas dan viabilitas, dimana semakin menurun persentase motilitas dan viabilitas maka semakin meningkat nilai persentase abnormalitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase abnormalitas spermatozoa, maka semakin tidak bagus pula kualitasnya.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung dapat mempengaruhi persentase abnormalitas spermatozoa pada sapi Limousin. ini juga

membuktikan bahwa penambahan sari tomat 10% (P1) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung dapat mempertahankan komposisi dan kondisi fisiologis pengencer, sehingga persentase abnormalitas spermatozoa sapi Limousin dapat dipertahankan. Sebagaimana dapat dilihat dari persentase abnormalitas spermatozoa yang lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan kontrol (P0). Rendahnya persentase abnormalitas spermatozoa pada perlakuan penambahan sari tomat 10% (P1) dibandingkan dengan perlakuan kontrol (P0), kemungkinan disebabkan karena adanya bahan antioksidan pada sari tomat.

Sari tomat terdapat kandungan vitamin C, dan vitamin E yang berperan sebagai antioksidan. Bahan ini dapat menghambat enzim yang menghasilkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga reaksi ROS dengan sel-sel normal seperti peroksidasi lemak dan kerusakan DNA spermatozoa dapat dicegah (Parwata, dkk, 2018). Kandungan antioksidan pada tomat juga berfungsi untuk menyangkal radikal bebas, hal ini didukung oleh Cahyadi *et al.*, (2017) yang menyatakan bahwa penurunan persentase abnormalitas disebabkan karena antioksidan yang menyangkal radikal bebas, yang dapat menyebabkan sel spermatozoa menjadi cacat atau abnormal. Pada tomat juga terdapat zat antioksidan bernama likopen. Likopen juga diketahui memberikan perlindungan terhadap oksidasi lipid, protein, dan DNA. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Zakiyah *et al.*, (2022) yang menyatakan bahwa likopen yang terkandung sari tomat berhasil menormalkan jumlah sperma abnormal mencit yang terpapar asap rokok tersier.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa pada kelompok perlakuan penambahan sari tomat 20% (P2) dan 30% (P3) lebih tinggi dibandingkan dengan dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung tanpa penambahan sari tomat (P0). Hal ini kemungkinan terjadi karena disebabkan dengan semakin tingginya konsentrasi sari tomat juga akan meningkatkan kandungan vitamin C dalam pengencer, sehingga akan mempercepat laju fruktolisis dan meningkatkan asam laktat dalam pengencer. Konsentrasi asam laktat yang tinggi akan mempercepat penurunan pH semen. Hal ini sesuai dengan pendapat Tani *et al.*, (2022) yang menyatakan bahwa, peningkatan

abnormalitas disebabkan oleh adanya proses peroksidasi lipid, perubahan tekanan osmotik akibat radikal bebas, dan asam laktat hasil dari proses metabolik, sehingga merusak membran plasma dan menyebabkan peningkatan abnormalitas sperma.

Peningkatan abnormalitas ini terjadi karena semakin lama semen cair disimpan maka semakin sedikit nutrisi yang tersedia bagi spermatozoa dan terjadi ketidakseimbangan tekanan osmotik sebagai akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama simpan dingin yang mempengaruhi perubahan fisik pada spermatozoa. Hal ini juga sejalan dengan pendapat Manehat *et al.*, (2021) yang menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa disebabkan oleh kejutan suhu dingin yang menyebabkan ketidakseimbangan tekanan osmotik sebagai akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung. Menurut Salisbury *et al.*, (1985) *cold shock* dan perubahan tekanan osmotik pada spermatozoa yang diejakulasi menyebabkan perubahan pembentukan spermatozoa yang dapat menyebabkan kelainan atau abnormal.

Peningkatan abnormalitas spermatozoa setelah proses pendinginan disebabkan oleh pengaruh fisik spermatozoa, dimana perubahan suhu akan menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel dinding spermatozoa sehingga menyebabkan pemecahan membran plasma, hal ini juga didukung oleh Susilawati, (2013) yang menyatakan bahwa spermatozoa cenderung mengalami kerusakan yang signifikan selama pengenceran dan penyimpanan pada suhu rendah. Peningkatan abnormalitas spermatozoa, tergantung penanganan yang dilakukan. Faktor lain yang mempengaruhi peningkatan abnormalitas adalah tindakan perlakuan yang kurang hati-hati, mencairkan semen yang tidak sama isotonisnya, panas, *cold shock*, dan gangguan nutrisi. Selain itu, terjadinya peningkatan abnormalitas spermatozoa juga diakibatkan oleh pengaruh fisik pada saat perlakuan, dimana spermatozoa bergesekan satu sama lain sehingga menyebabkan kelainan dan kematian.

Kesimpulan

Penambahan sari tomat dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung berpengaruh terhadap motilitas, viabilitas, dan

abnormalitas semen sapi Limousin. Penambahan sari tomat sebanyak 10% (P1) dalam pengencer natrium sitrat dan kuning telur ayam kampung merupakan perlakuan terbaik dalam mempertahankan motilitas yaitu 42,00% selama penyimpanan 48 jam, viabilitas 62,10% selama penyimpanan 72 jam, dan abnormalitas 16,60% selama penyimpanan 72 jam pada semen cair sapi Limousin.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Dosen pembimbing dan berbagai pihak yang membantu dalam menyelesaikan penelitian ini dengan baik.

Referensi

- Alam G. Yusaq, Enniek H, Irida N, Ahmad F, Wike A. Septian, Woro B, & Suyadi. (2020). Analisis Hubungan Bobot Badan terhadap Produksi Semen Sapi Limousin di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari. *Ternak Tropika*. **21**(2):231-236. DOI: <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2020.02.1.02.6>.
- Astuti M. Eka. (2017). Pengaruh Penambahan Sari Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*) Sebagai Pengencer Alami terhadap Kualitas Penyimpanan Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*). *Jurnal Bionature*. **18**(2):129-139. DOI: <https://doi.org/10.35580/bionature.v18i2.6144>.
- Cahyadi T, Christiyanto M, & Setiatin E. (2017). Persentase Hidup dan Abnormalitas Sel Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah (PE) dengan Pakan yang Disuplementasi Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis). *Animal Agriculture Journal*. **5**(3):23-32. DOI: <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/aaj>.
- Combs, F.G. (1992). *The Vitamins: Fundamental Aspects in Nutrition and Health*. Academic Press Inc, New York. ISBN: 0121834921, pp: 618.

- Garner, D.L. & E.S.E. Hafez. (2000). Spermatozoa and Plasma Semen. In: *Reproduction in Farm Animals*. E.S.E. Hafez and B. Hafez (eds). 7th Ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA. DOI: [10.1002/9781119265306.ch7](https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7), pp: 96-109.
- Hafez, E. S. E. & B. Hafez. (2000). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Blackwell Publishing. South Carolina, USA. ISBN: 9781119265306, pp: 509.
- Hamdana A, Sonjaya H, & Toleng A. L. (2019). Pengaruh Pemberian Heparin pada Level yang Berbeda pada Semen Beku Sapi Limousin Hasil Sexing dengan Menggunakan Albumen Telur Ayam. *Jurnal Peternakan Lokal*. 1(2):21-27. DOI: <https://doi.org/10.46918/peternakan.v1i2.273>.
- Hammerstedt, R.H. (1993). Maintenance of Bioenergetic Balance in Sperm and Prevention of Lipid Peroxydation: A Review Of The Effect On Design Of Storage Preservation System. *Reproduction and Fertil Dev*, USA.
- Harbin A, Henderiana L. Loiuisa, & Wilmientje M. (2017). Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Babi Landrace dalam Pengencer Sitrat Kuning Telur dengan Penambahan Level Sari Buah Mengkudu yang Berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 3(2):177-183. DOI: <https://doi.org/10.35508/nukleus.v3i2.804>.
- Ihsan, N.M, (2011). Penggunaan Telur Itik Sebagai Pengencer Semen Kambing. *Jurnal Ternak Tropika*. 12(1):10-14. DOI: <https://doi.org/10.19087/imv.2018.7.3.252>.
- Kartasudjana, R. (2001). *Tehnik Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Departemen Pendidikan Nasional Proyek Pengembangan Sistem dan Standar Pengolahan, Jakarta.
- Kusumawati E. D, Betu Hilareus, Krisnaningsih A. T. N, & Rahadi S. (2018). Kualitas Semen Segar Sapi Limousin pada Lama Simpan yang Berbeda. *Jurnal Ilmiah Fillia Cendekia*. 3(1):1-9. DOI: <https://doi.org/10.32503/fillia.v3i1.162>
- Kusumawati Enike. (2017). *Inseminasi Buatan*. Media Nusa Creative, Malang. ISBN: 9786020839684, pp: 75.
- Lehninger, A. I. (1993). *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*, Ahli Bahasa: M. Thenawijaya. Erlangga, Jakarta. ISBN: 520040000134, pp: 369.
- Manehat F, Agustinus A, & Paulus K. (2021). Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas Spermatozoa dan pH Semen Sapi Bali dalam Pengencer Sari Air Tebu-Kuning Telur yang Disimpan dalam Waktu yang Berbeda. *Tropical Animal Science Journal*. 3(2): 76-90. DOI: <https://doi.org/10.32938/jtast.v3i2.1032>.
- Meo M. Yosefina, Sipora P. Telnoni, & Hory I. (2022). Kualitas Spermatozoa Sapi Angus (*Bos Taurus*) dalam Pengencer Tris Kuning Telur dengan Substitusi Ekstrak Sari Buah Tomat. *Flobamora Biological Jurnal*. 1(1):10-16. DOI: <https://doi.org/10.35508/nukleus.v10i1.8347>.
- Mukhlis, Dasrul, & Sugito. (2017). Analisis Motilitas Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan dalam Berbagai Konsentrasi Andromed. *Jurnal Agripet*. 17(2):112-120. DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v17i2.8373>.
- Mustaqilla S, Dasrul, & Hamdan. (2020). Pengaruh Konsentrasi Kuning Telur Angsa dalam Medium Sitrat dan Lama Waktu Pendinginan pada Suhu 5°C terhadap Integritas Membran Plasma Sapi Aceh. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*. 4(1):30-38. DOI: <https://doi.org/10.21157/jim%20vet.v4i1.4818>.
- Noviyandi F, Sumartono, & Inggit Kentjonowaty. (2019). Pengaruh Penambahan Sari Semangka dan Tomat dalam Pengencer Andromed Pada Berbagai Lama Simpan Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer. *Jurnal Rekasatwa*. 2(1): 78-83.
- Parwata, A, Manuaba, P, & Yasa, S. (2018). The Potency of Flavonoid Compounds in

- Water Extract Gyrinops Versteegii Leaves as Natural Antioxidants Sources. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 11(3): 1501-1511. DOI: <https://dx.doi.org/10.13005/bpj/1517>.
- Putra I, Wayan B, & Made K. (2019). Pengaruh Penambahan Berbagai Konsentrasi Vitamin E pada Pengencer Fosfat Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Puyuh. *Buletin Veteriner Udayana*. 11(1):58-64. DOI: <https://doi.org.10.24843/bulvet.2019.v11.i01.p10>.
- Riyadhi Muhammad, M. Rizal, & M. Thahir. (2020). Motilitas Daya Hidup Spermatozoa Asal Epididimis Sapi Persilangan yang Diencerkan dengan Air Tebu. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 7(1):70-76. DOI: <https://dx.doi.org/10.33772/jitro.v7i1.8855>.
- Salisbury, G. W. & N. L. Van Denmark. (1985). Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. ISBN: 164100685, pp: 75.
- Suhartati L, Udin Z, & Rizqan. (2020). Laju Penurunan Suhu Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin Menggunakan Medium Pengencer Susu Segar dan Tris Kuning Telur. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 22(3):284-291. DOI: <https://doi.org/10.25077/jpi.22.3.284-291.2020>.
- Susilawati, T. (2011). Spermatologi. UB Press, Malang. ISBN: 9786028960045, pp: 176.
- Susilawati, T. (2013). Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak. UB Press, Malang. ISBN: 9786022034582, pp: 132.
- Tanii Y. R, Agustinus A, Dethan, & Theresia I. (2022). Pengaruh Pengencer Ekstrak Air Tebu dalam Sitrat-Kuning Telur terhadap Viabilitas dan Abnormalitas Spermatozoa, serta pH Semen Sapi Bali. *Journal of Tropical Animal Science and Technology*. 4(1):56-65. DOI:<https://doi.org.10.32938/jtast.v4i1.1098>.
- Toelihere, M. R. (1993). Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung. ISBN: 9794044792, pp: 292.
- Toelihere, M.R. (1981). Biological Aspects of Reproduction and Insemination of Swamp Buffalo. ASPAC. FFTC. Book Series, Taipei. pp: 41-45.
- Yahaq M. A, Ondho Y. S, dan Sutiyono. (2019). Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Semen Sapi Limousin yang Dibekukan terhadap Kualitas Post Thawing. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 14(4):380-386. DOI: <https://doi.org/10.31186/jspi.id.14.4.380-386>.
- Zakiah A, Sukarjati, & Andriani V. (2022). Sari Buah Stroberi (*Fragaria vesca i*), Sari Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*), dan Kombinasi Antara Kedua Sari Buah untuk Meningkatkan Kualitas Spermatozoa Mencit yang Terpapar Asap Rokok Elektrik. *Jurnal Ilmiah Biologi*. 10(1):141-155. DOI: <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v10i1.4803>.
- Zein, U & Emir, E. (2019). Buku Ajar Ilmu Kesehatan (Memahami Gejala, Tanda, dan Mtds) ISBN: 9786028960045, pp: 176
Press, Malang. ISBN: 9786230200632, pp: 244.