



Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental pada Pengencer TRIS dengan Kuning Telur dan Waktu Equilibrasi yang Berbeda

(The quality of Simmental cattle sperm in TRIS diluent with different egg yolks and equilibration times)

Yendraliza^{1*}, Ahmaddyan Sitorus¹, Muhammad Rodiallah¹, dan Zumarni¹

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian dan Peternakan, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau, Pekanbaru, Indonesia

ABSTRAK. Tujuan penelitian adalah untuk melihat kualitas spermatozoa sapi Simmental pada pengencer tris kuning telur yang berasal dari tiga jenis unggas dengan variasi waktu equilibrasi. Semen ditampung menggunakan vagina buatan dari 2 ekor sapi Simmental dari BIB Buah Sakato, Payakumbuh, Sumatera Barat. Penampungan dilakukan pagi hari, 1 x seminggu selama 10 minggu. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dua faktor. Faktor pertama Jenis kuning telur yang digunakan (Puyuh, Ayam, dan Itik) dan faktor kedua adalah waktu equilibrasi (2, 3 dan 4 jam). Titik optimum ditentukan dengan uji regresi. Parameter diukur setelah thawing meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, membrane plasma utuh dan recovery rate. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa penggunaan kuning telur asal ternak ayam menghasilkan motilitas 65.33%, viabilitas 67.7%, abnormalitas 15%, MPU 50% dan nilai recovery rate 87.11%, kuning telur itik menghasilkan motilitas 67%, viabilitas 72%, abnormalitas 12%, MPU 54%, dan recovery rate 89.5% dan kuning telur puyuh menghasilkan motilitas 65.00%, viabilitas 70.67%, abnormalitas 13.33%, MPU 51.33% dan nilai recovery rate 86.67%. Kesimpulan penggunaan telur itik dalam pengencer tris pada spermatozoa sapi Simmental dengan waktu equilibrasi 2 jam lebih baik dari waktu equilibrasi 3 dan 4 jam.

Kata kunci: abnormalitas, membrane plasma utuh, motilitas, recovery rate, viabilitas

ABSTRACT. Aim of this research was to conduct the quality of sperm Simmental bull in egg yolk tris diluent from three types of poultry with variations in the equilibration time. Semen is collected using an artificial vagina from 2 Simmental cows from BIB Buah Sakato, Payakumbuh, West Sumatra. The semen is carried out in the morning, once a week for 10 weeks. The experiment was design with two factor Randomized Block Design (RBD). The first factor was the type of egg yolk used and the second factor was the equilibration time. The optimum point is determined by regression. Parameters measured after thawing included motility, viability, abnormalities, intact plasma membrane and recovery rate. The results showed that using of chicken in 65.33% motility, 67.7% viability, 15% abnormality, 50% integrity membrane plasma, and 87.11% recovery rate; duck egg yolk resulted in 67% motility, 72% viability, 12% abnormality, 54% integrity membrane plasma, and 89.5% recovery rate; quail egg yolk resulted 65% motility, 70.67% viability, 12% abnormality, 51.33% integrity membrane plasma, and 86.67% recovery rate; The conclusion is that the use of duck eggs in tris diluent with a equilibration time of 2 hours is better than 3 and 4 hours for bull Simmental spermatozoa.

Keywords: abnormality, integrity membrane plasma, motility, recovery rate, viability

PENDAHULUAN

Sapi Simmental merupakan sapi eksotik yang banyak diminati oleh peternak. Sapi Simmental merupakan tipe sapi yang memiliki berat badan di atas sapi lokal. Pengembangbiakan sapi Simmental sebagian besar dilakukan dengan Inseminasi Buatan (IB). Kualitas sperma untuk Inseminasi Buatan ditentukan oleh jenis bahan pengencer yang digunakan. Untuk mempertahankan daya fertilitas sperma selama proses preservasi dan pengawetan dipengaruhi oleh konsentrasi kriopektan, waktu equilibrasi dan suhu yang digunakan (Seshoka *et al.*, 2016). Setiap spermatozoa punya waktu penyesuaian

yang berbeda dengan pengencer saat waktu pembekuan (Shahverdi *et al.*, 2014). Kuning telur mempunyai komponen lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa (Manjunath, 2012). Low Density lipoprotein (LDL) dari kuning telur dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Lipoprotein kuning telur terdiri dari 85% lemak dan 15 % protein. Lemak kuning telur terdiri dari 20% fosfolipid, 60% lemak netral (trigliserida) dan 5% kolesterol. Komposisi komponen kuning telur berbeda pada masing-masing jenis unggas (Polat *et al.*, 2013). Bathgate *et al.* (2006) menyatakan bahwa setiap kuning telur memiliki efek kriopreservatif yang berbeda karena mengandung asam lemak, fosfolipid dan kolesterol yang berbeda. Penggunaan asal kuning telur yang berbeda untuk

*Email Korespondensi: yendraliza@uin-suska.ac.id
Diterima: 12 Juni 2022
Direvisi: 28 Juli 2022
Disetujui: 19 Oktober 2022
DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v23i1.26381>

pengawetan sperma dalam pengencer tris telah dimulai oleh Su *et al.* (2008) pada 5 jenis kuning telur, dan Akhter *et al.* (2011) pada 3 jenis kuning telur tetapi reaksi waktu equilibrasi dengan berbagai kuning telur pada semen sapi Simmental belum dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah mencari waktu equilibrasi dan jenis kuning telur yang dapat mempertahankan motilitas, persentase hidup, MPU dan RR serta menekan angka abnormal pada sperma sapi Simmental.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan semen dari 2 ekor sapi Simmental dari Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Tuah Sakato yang berumur 7 tahun dengan bobot badan 700-800kg. Sapi dipelihara dengan standar operasional prosedur (SOP) dari BIBD Tuah Sakato. Koleksi semen dilakukan pada pagi hari selama 10 kali penampungan sebagai ulangan. Bahan pengencer yang digunakan adalah tris kuning telur. Kuning telur yang digunakan dibedakan atas 3 perlakuan yaitu 3 jenis unggas (Puyuh, Itik dan Ayam ras). Waktu equilibrasi yang digunakan dibedakan atas 3 perlakuan yaitu 2, 3, 4 jam. Ministraw yang dibuat pada masing-masing perlakuan adalah 10 straw sebagai ulangan.

Bahan Pengencer

Semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Sygma (St. Louis, MO, USA). Bahan pengencer tris dibuat dengan mencampurkan 3.634g tris (hydroxymethylaminomethane), 1.7 g citric acid, 1.25g fructose, 6 ml glycerol (merck, Germany) kemudian dilarutkan ke dalam air 100 ml aquabidest. Buffer tris 80 ml ditambah kuning telur 20 ml, dihomogenkan dan disentrifugasi 3000rpm selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan antibiotik Benzyl penicillin (1000 IU/ml, Pharmacia &Upjohn, Belgium), streptomycin sulphate (1000 µg/ml, Pharmacia &Upjohn, Belgium) dan 7 ml gliserol.

Penampungan Semen

Semen ditampung menggunakan vagina buatan (IMV, France) pada suhu 42°C dari sapi Simmental. Semen yang telah ditampung dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Semen yang memiliki motilitas > 70% yang digunakan untuk proses selanjutnya.

Pengolahan Semen

Semen yang telah ditampung dan dievaluasi dibagi dalam 3 bagian dan masing-masing diencerkan dengan pengencer tris dan kuning telur yang berbeda. Semen diencerkan dengan dosis pengenceran konsentrasi 100 juta sel per ml (25 juta sel/straw). Selanjutnya dikemas ke dalam ministraw. Setelah semen dikemas, semen diequilibrasi pada suhu 5°C selama 2, 3 dan 4 jam guna melihat waktu kemampuan sperma menyesuaikan diri dengan pengencer. Pembekuan dilakukan menggunakan mesin pembekuan otomatis dan kemudian semen beku dimasukkan ke dalam container yang berisi nitrogen cair selama 24 jam.

Uji Kualitas Semen

Semen beku dithawing setelah 24 jam selama 30 detik di dalam air dengan suhu 37 °C. Kedua ujung sumbat straw dipotong dan dimasukkan ke dalam micro tube. Sperma dievaluasi untuk menentukan nilai motilitas, viabilitas, keutuhan membrane plasma dan recovery rate.

Parameter yang Diukur

Motilitas. Motilitas spermatozoa diuji dengan cara meneteskan semen yang telah dithawing di atas gelas objek yang bersih dan ditutup dengan cover glass. Spermatozoa diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 x 45 (450x). Selanjutnya dihitung gerakan-gerakan spermatozoa yang maju ke depan dibagi dengan jumlah sperma yang dihitung (200 ekor) dikalikan 100% (Toelihere, 1993).

Abnormalitas. Persentase abnormalitas diamati dengan membuat preparat ulas pada gelas objek dari satu tetes spermatozoa yang dicampurkan dengan satu tetes eosin-nigrosin. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 45. Spermatozoa yang abnormal dihitung dibagi dengan jumlah sperma yang dihitung sampai 200 sel dikalikan 100% (Toelihere, 1993).

Viabilitas. Persentase hidup dilakukan dengan pewarnaan diferensial. Satu tetes spermatozoa yang sudah dithawing diletakkan di atas gelas objek dan ditambahkan satu tetes eosin. Selanjutnya dicampurkan dengan merata menggunakan gelas batang steril. Preparat ulas yang tipis dikeringkan di atas nyala api, kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 45 x 10. Spermatozoa yang mati akan menyerap warna merah, sedangkan spermatozoa yang hidup tetap berwarna bening.

Persentase hidup spermatozoa dihitung dengan menjumlahkan spermatozoa yang hidup dibagi dengan total semua spermatozoa yang dihitung dikalikan 100% (Toelihere, 1993).

Membran plasma utuh. Persentase membrane plasma utuh (MPU) dilakukan dengan menggunakan *hypoosmotic swelling* (HOS) test (Jeyendran *et al.*, 1984). Prosedur yang digunakan adalah mencampurkan 2.7 g fruktosa, 0.47 g natrium sitrat dengan 100 ml akuabidest dan dihomogenkan. Selanjutnya dicampurkan 0.1 ml semen ditambahkan 9.9 ml medium HOS dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C dalam water bath. Semen yang telah diinkubasi dievaluasi di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 45. Spermatozoa yang memiliki membrane plasma utuh ditandai oleh ekor menggebu atau melingkar sedangkan spermatozoa yang rusak ditandai dengan ekor yang lurus. Nilai persentase MPU dihitung dari total spermatozoa yang bereaksi dibagi dengan total spermatozoa yang dihitung dikalikan 100%.

Recovery rate. Nilai Recovery Rate didapatkan dari membandingkan nilai motilitas spermatozoa setelah thawing dengan motilitas spermatozoa sebelum diencerkan dikali 100 % (Arifiantini & Purwantara, 2010).

Analisa data

Data dianalisis dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dua faktor dengan 10 ulangan. Faktor pertama jenis kuning telur (ayam, itik, puyuh) dalam pengencer tris, faktor kedua lama waktu equilibrasi (2, 3, 4 jam). Untuk melihat titik optimum pengaruh perlakuan dilakukan uji korelasi menggunakan aplikasi Minitab.

HASIL DAN PEMBAHASAN

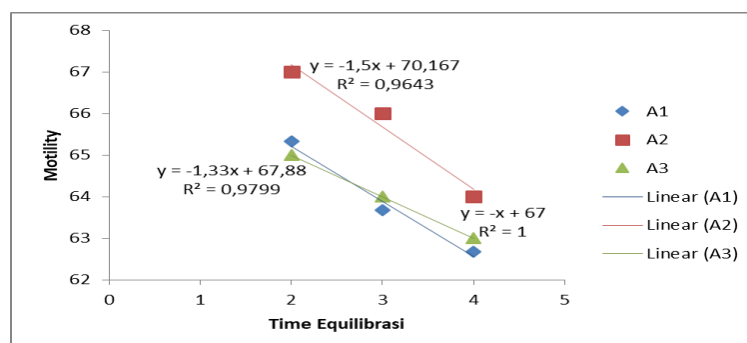
Nilai motilitas, plasma membrane integritas dan recovery rate sperma sapi Simmental dalam

pengencer Tris dipengaruhi oleh jenis kuning telur dan waktu equilibrasi (Tabel 1). Jenis kuning telur dan waktu equilibrasi yang terbaik adalah kuning telur asal itik dengan 2 jam waktu equilibrasi.

Motilitas

Rataan kualitas sperma sapi Simmental pada jenis kuning telur dan waktu equilibrasi yang berbeda menghasilkan motilitas yang berbeda nyata (Grafik 1). Setiap pengurangan waktu equilibrasi dapat meningkatkan motilitas sperma sapi Simmental sebesar 70.16 pada tris kuning telur yang berasal dari itik dengan nilai kedekatan 96% (Grafik 1). Kemampuan spermatozoa sapi Simmental dalam menyesuaikan diri dengan jenis pengencer tris kuning telur itik adalah 2 jam (67%). Baiknya nilai kedekatan pada penggunaan tris kuning telur dari itik, kemungkinan disebabkan kandungan kolesterol yang dimiliki telur itik juga besar lebih besar dibandingkan kuning telur yang lainnya (Ariyani, 2006). Perumal *et al.* (2016) menyatakan bahwa pemberian kuning telur sampai 10% dapat mempertahankan motility spermatozoa dalam pengencer tris. Kuning telur merupakan sumber energi bagi spermatozoa selama preservasi. Energi ini didapatkan dari proses glikolisis berupa adenosine trifosfat (ATP), sehingga motilitas dan daya hidup spermatozoa dapat dipertahankan (Barbonetti *et al.*, 2010).

Motilitas ini berbeda dengan motilitas spermatozoa domba dengan pengencer tris kuning telur itik (44,00±20,37%) (Dwitariizki *et al.*, 2015) dan motilitas sapi Sahiwal menggunakan tris kuning telur merpati pada waktu pembekuan 0, 2 dan 4 jam (Akhter *et al.*, 2011). Perbedaan ini disebabkan perbedaan jenis semen ternak yang digunakan, jenis kuning telur yang digunakan, pengencer dan waktu equilibrasi yang berbeda (Ferdinand *et al.*, 2014).



Grafik 1. Motilitas sperma sapi Simmental pada pengencer tris kuning telur yang berbeda dengan variasi waktu equilibrasi.

Keterangan: A1 = kuning telur ayam ras, A2 = kuning telur itik, A3 = kuning telur puyuh

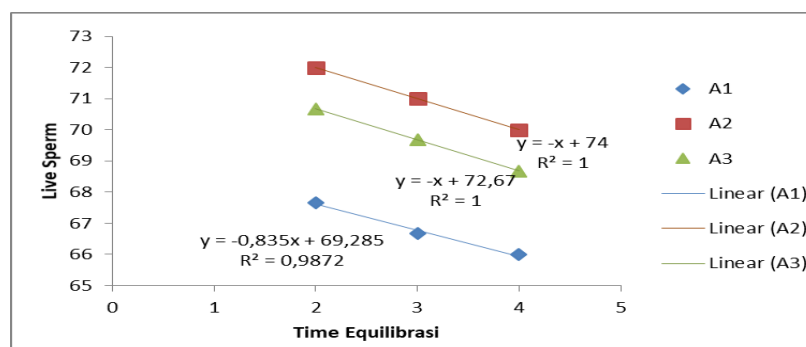
Persentase Hidup

Persentase hidup spermatozoa sapi Simmental makin tinggi pada semua waktu equilibrasi dengan jenis kuning telur yang berbeda. Setiap pengurangan waktu equilibrasi dapat meningkatkan persentase hidup sperma sapi Simmental sebesar 74 % pada pengencer tris kuning telur itik. Nilai kedekatannya berkisar 0.01 % ($r^2 = 1$) (Grafik 2). Waktu yang dibutuhkan spermatozoa sapi Simmental dengan pengencer tris kuning telur itik dengan waktu 4 jam. Hal ini disebabkan karena telur itik memiliki kuning telur yang lebih besar sehingga kadar kolesterol yang

dimiliki juga lebih banyak. Selain itu jumlah asam amino yang ada dalam kuning telur akan lebih banyak sehingga kemampuannya melindungi spermatozoa sampai thawing lebih kuat (Andrabi *et al.*, 2008). Nilai persentase hidup sapi Simmental ini berbeda dengan Persentase hidup sapi Simmental di Lampung (Pratiwi *et al.*, 2014) yang menggunakan pengencer Andromed dan persentase hidup sapi Brahman (Novita *et al.*, 2019). Perbedaan ini disebabkan jenis pengencer yang digunakan, jenis ternak yang menghasilkan semen, waktu equilibrasi dan metode pengenceran yang berbeda (Akal *et al.*, 2014).

Tabel 1. Nilai motilitas, viabilitas, abnormalitas, membran plasma integritas dan recovery rate spermatozoa sapi Simmental

Variabel (%)	Asal kuning telur	Waktu equilibrasi (jam)		
		3	4	5
Motility	Ayam	51.33±2.53 ^{bB}	50.33±2.26 ^{bB}	48.33±1.41 ^{aA}
	Itik	53.67±0.58 ^{aB}	52.67±0.46 ^{aA}	51.67±0.31 ^{aA}
	Puyuh	52.33±0.5 ^{cB}	50.33±1.4 ^{cB}	49.00±1.9 ^{bB}
Viabilitas	Ayam	68.00±0.0	67.00±2.2	66.00±2.5
	Itik	72.00±1.3	70.33±2.4	70.00±1.2
	Puyuh	70.67±5.4	69.67±3.5	68.67±2.2
Abnormality	Ayam	15.00±4.0	17.00±4.2	16.00±2.5
	Itik	13.33±1.3	14.67±2.4	15.33±1.2
	Puyuh	14.67±5.4	14.67±5.5	15.00±3.2
Plasma membrane integrity	Ayam	41.67±0.58 ^{bB}	40.67±3.50 ^{bB}	39.33±1.15 ^{aA}
	Itik	44.33±2.39 ^{bB}	42.33±3.46 ^{aB}	40.67±3.40 ^{aA}
	Puyuh	43.00±1.06 ^{bA}	42.00±3.90 ^{bA}	41.56±3.65 ^{bA}
Recovery rate	Ayam	87.11±5.29 ^{aB}	84.89±1.27 ^{aB}	83.56±9.01 ^{aA}
	Itik	89.33±0.39 ^{aB}	88.00±0.46 ^{aB}	85.33±0.31 ^{aA}
	Puyuh	86.67±5.06 ^{aA}	85.33±3.91 ^{aA}	84.00±7.65 ^{bA}



Grafik 2. Persentase hidup spermatozoa sapi Simmental pada pengencer tris kuning telur yang berbeda dengan variasi waktu equilibrasi.

Keterangan: A1 = kuning telur ayam ras, A2 = kuning telur itik, A3 = kuning telur puyuh

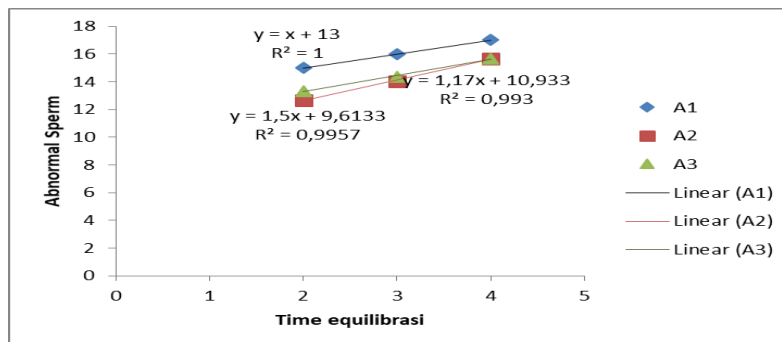
Abnormalitas

Setiap penambahan waktu equilibrasi meningkatkan persentase abnormalitas sebesar 11.11- 14.00 % pada semua jenis kuning telur dalam pengencer tris (Grafik 3). Rata-rata nilai persentase abnormalitas pada pengencer tris kuning telur asal ternak puyuh, Ayam Ras, dan Itik dengan 3 waktu equilibrasi (2, 3, 4 jam) masih

layak digunakan sebagai bahan pengencer. BSN (2017) menyatakan bahwa abnormalitas yang kurang dari 20% layak dipakai untuk inseminasi buatan. LDL yang ada dalam kuning telur mengikat protein PDC-109 sehingga mencegah terjadinya efluks fosfolipid, sehingga abnormalitas spermatozoa dapat ditekan (Bergeron *et al.*, 2007).

Nilai persentase abnormal ini lebih tinggi dari sapi Simmental dengan pengencer sari wortel (Yendraliza *et al.*, 2019) dan domba Garut serta domba Priangan (Afiati, 2015). Perbedaan ini

disebabkan jenis ternak berbeda, jenis pengencer berbeda, metode pengencer yang berbeda dan metode penampungan semen yang berbeda (Garner & Hafez, 2016).



Grafik 3. Abnormalitas sapi Simmental pada pengencer tris kuning telur yang berbeda dengan variasi waktu equilibrasi.

Keterangan: A1 = kuning telur ayam ras, A2 = kuning telur itik, A3 = kuning telur puyuh

Membran Plasma Utuh (MPU)

Setiap penambahan waktu equilibrasi menurunkan MPU spermatozoa sapi Simmental sampai 55.11 %. Dengan nilai kedekatan adalah 97- 99% namun pada tris kuning telur puyuh nilai kedekatannya rendah (0.01%) pada semua waktu equilibrasi. (Grafik 4). Hal ini diduga kandungan kuning telur dari ternak Puyuh lebih rendah dari ternak itik dan ternak ayam. Hal ini sejalan dengan kualitas spermatozoa domba dengan jenis kuning telur dari unggas yang berbeda (Bathgate *et al.*, 2006). Lesitin yang ada dalam kuning telur akan melindungi membrane plasma spermatozoa saat pembekuan dan thawing, sehingga semakin besar kuning telur ternak unggas maka akan semakin tinggi konsentrasi lecithin yang ada dalam kuning telur (Wu *et al.*, 2015). Selain itu perbedaan MPU antar perlakuan disebabkan perbedaan motilitas dan persentase hidup sperma. Manjunath (2012) menyatakan bahwa motilitas spermatozoa akan memengaruhi MPU.

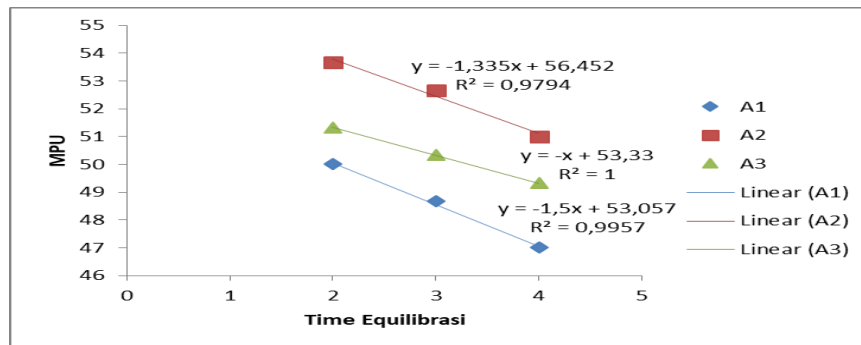
Nilai MPU spermatozoa sapi Simmental dalam penelitian ini lebih tinggi dari MPU sapi Simmental dengan pengencer sari wortel pada 5 jam waktu equilibrasi (Yendraliza *et al.*, 2019) dan sapi Simmental di Lampung (Pratiwi *et al.*, 2014). Perbedaan ini disebabkan jenis pengencer yang digunakan berbeda. Selain itu setiap spermatozoa memiliki waktu adaptasi yang berbeda antara pengencer dengan waktu equilibrasi (Akal *et al.*, 2014). Adanya kolesterol dalam kuning telur mengurangi reaksi akrosom spontan dan kekurangan kolesterol akan meningkatkan reaksi akrosom (Srivastava *et al.*, 2013). Mekanisme utama low density lipoprotein

(LDL) dalam melindungi spermatozoa adalah melalui sekuestrasi protein BSP yang bertanggung jawab terhadap pengeluaran kolesterol membrane. Selain LDL yang berfungsi sebagai gelatin dalam pengawetan sperma (Perumal *et al.*, 2018).

Recovery Rate

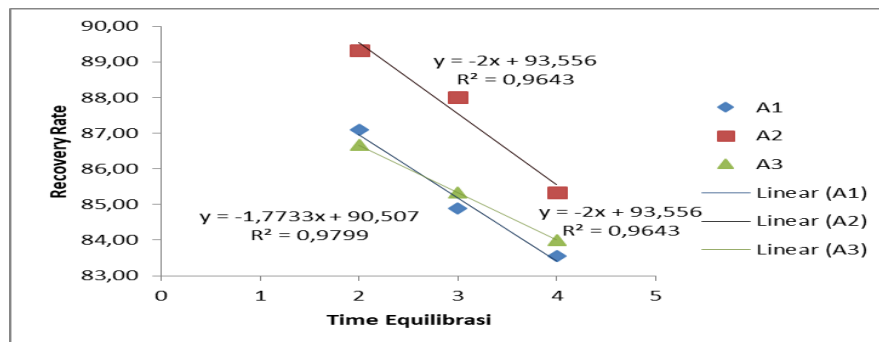
Setiap penambahan waktu equilibrasi meningkatkan waktu bagi spermatozoa untuk kembali aktif antara 6.3 – 8.45 %. Dengan nilai kedekatan 96% - 97 % pada jenis kuning telur asal ayam broiler dan kuning telur asal itik. Sedangkan pada tris kuning telur dari telur puyuh kedekatannya amat lemah (0.01%) (Grafik 5). Artinya kemampuan spermatozoa sapi Simmental amat lemah pada pengencer tris kuning telur asal ternak puyuh pada semua waktu equilibrasi. Hal ini kemungkinan disebabkan komposisi kuning telur yang berbeda, sehingga kandungan kolesterol yang dapat melindungi spermatozoa saat pembekuan dan thawing juga berbeda. Namun nilai recovery rate spermatozoa sapi Simmental dalam penelitian ini di atas standar yang telah ditentukan oleh (Standar Nasional Indonesia) SNI 4869-1 Tahun 2017 (50%).

Nilai recovery rate spermatozoa sapi Simmental dalam penelitian ini lebih tinggi dari spermatozoa sapi Bali pada pengencer tris kuning telur dengan variasi level sukrosa (Yendraliza *et al.*, 2019) dan spermatozoa sapi Bali pada pengencer tris kuning telur dan andromed (Yendraliza *et al.*, 2020). Perbedaan ini disebabkan perbedaan motilitas semen segar, pengencer dan pembekuan (Garner & Hafez, 2016).



Grafik 4. Membran plasma utuh (MPU) sapi Simmental pada pengencer tris kuning telur yang berbeda dengan variasi waktu equilibrasi.

Keterangan: A1 = kuning telur ayam ras, A2 = kuning telur itik, A3 = kuning telur puyuh



Grafik 5. Recovery rate (RR) sapi Simmental pada pengencer tris kuning telur yang berbeda dengan variasi waktu equilibrasi.

Keterangan: A1 = kuning telur ayam ras, A2 = kuning telur itik, A3 = kuning telur puyuh

KESIMPULAN

Penggunaan telur itik dalam pengencer Tris kuning telur dengan waktu equilibrasi 2 jam menghasilkan motilitas, persentase sperma hidup, membrane plasma utuh dan recovery rate yang baik dibandingkan dengan penggunaan telur puyuh dan ayam dalam waktu equilibrasi 3 dan 4 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Kepala BIB Tuah Sakato dan jajarannya, tim peneliti serta seluruh pihak yang membantu proses penelitian ini sampai selesai.

DAFTAR PUSTAKA

Afiati, F. 2015. Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. In Pros Sem Nas Masy Biodiv Indonesia, pp: 930–934. <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m010449>
 Akal, E., Kocyigit, A., Selcuk, M. 2014. Role of Low Density Lipoproteins in Semen Preservation. *Kocatepe Veterinary Journal*.

7(1): 69–74. <https://doi.org/10.5578/kvj.7429>
 Akhter, S., Rakha, B.A., Andrabi, S.M.H., Ansari, M. 2011. Comparison of egg yolks from three avian species in extender for cryopreservation of Sahiwal bull epididymal spermatozoa. *Animal Science Papers and Reports*. 29(2): 131–138.
 Andrabi, S.M.H., Ansari, M.S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood, A., Akhter, S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 104(2–4): 427–433. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.003>
 Arifiantini, R., and Purwantara, B. 2010. Motility and viability of friesian holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 35(4):222-226 <https://ejournal.undip.ac.id/index.php/jitaa/article/view/7526/6180>
 Ariyani, E. 2006. Penetapan Kandungan Kolesterol Dalam Kuning Telur Ayam Petelur. In Prosiding Temu Teknis Tenaga

- Fungsional Pertanian: Profesionalisme Tenaga Fungsional dalam mendukung Revitalisasi Pertanian, Bogor 7-8 September 2006 pp:12–15. http://balitnak.litbang.pertanian.go.id/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=70:3&download=1193:3&Itemid=1
- Barbonetti, A., Vassallo, M.R.C., Fortunato, D., Francavilla, S., Maccarrone, M., Francavilla, F. 2010. Energetic metabolism and human sperm motility: Impact of CB1 receptor activation. *Endocrinology*. 151(12):5882–5892. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0484>
- Bathgate, R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. 2006. Studies on the Effect of Supplementing Boar Semen Cryopreservation Media with Different Avian Egg Yolk Types on in Vitro Post-thaw Sperm Quality. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(1): 68–73. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x>
- Bergeron, A., Brindle, Y., Blondin, P., Manjunath, P. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biology of Reproduction*. 77(1): 120–126. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058248>
- Dwitarizki, N.D., Ismaya, Asmarawati, W. 2015. Pengaruh Pengenceran Sperma dengan Air Kelapa Dan Aras Kuning telur Itik serta Lama Penyimpanan Terhadap Motilitas Dan Viabilitas Spermatozoa Domba Garut Pada Penyimpanan 5°C. *Buletin Peternakan*. 39(3): 149–156. <https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v39i3.7979>
- Ferdinand, N., Ngwa, T.D., Augustave, K., Henri Dieudonné, B.P., Willington, B.O., D'Alex, T.C., Joseph, T. 2014. Effect of egg yolk concentration in semen extender, pH adjustment of extender and semen cooling methods on bovine semen characteristics. *Global Veterinaria*. 12(3): 292–298. <https://doi.org/10.5829/idosi.gv.2014.12.03.8236>
- Garner, D.L., and Hafez, E.S.E. 2016. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals* Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>
- Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B.G., Zaneveld, L.J.D. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*. 70(1): 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Manjunath, P. 2012 New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim. Reprod*. 9(4): 809–815. Retrieved from <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v9n4/p809-815.pdf>
- Novita, R., Karyono, T., dan Rasminah, R. 2019. Kualitas Semen Sapi Brahman pada Persentase Tris Kuning Telur yang Berbeda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 14(4): 351–358.
- Perumal, P., Chang, S., Ezung, E., Khan, M.H., Vupru, K., Khate, K. 2018. Effect of egg yolk powder on cryopreservation of mithun semen Effect of egg yolk powder on cryopreservation of mithun semen. *Indian Journal of Animal Sciences*. 88(1): 46–49.
- Perumal, P., Srivastava, S.K., Ghosh, S.K., Baruah, K.K., Khan, M.H., Rajoriya, J.S., Srivastava, N. 2016. Effect of low density lipoprotein on replacement of egg yolk in liquid preservation of mithun semen. *Indian Journal of Animal Sciences*. 86(4): 55–57.
- Polat, E., Citil, O., Garip, M. 2013. Fatty acid composition of yolk of nine poultry species kept in their natural environment. *Animal Science Papers and Reports*. 31(4): 363–368.
- Pratiwi, R.I., Suharyati, S., Hartono, M. 2014. Analisis Kualitas Semen Beku Sapi Simmental Menggunakan Pengencer Andromed dengan Variasi waktu Pre Freezing. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(3): 8–15.
- Seshoka, M.M., Mphaphathi, M.L., Nedambale, T.L. 2016. Comparison of four different permitting and combination of two best cryoprotectants on freezing Nguni sperm evaluated with the aid of computer aided sperm analysis. *Cryobiology*. 72(3): 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.04.001>
- Shahverdi, A., Rastegarnia, A., Topraggaleh, T.R. 2014. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin

- structure of buffalo bull (*Bubalus Bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal*. 16(3): 279–288.
- Srivastava, N., Jerome, A., Srivastava, S.K., Ghosh, S.K., Kumar, A. 2013. Bovine seminal PDC-109 protein: An overview of biochemical and functional properties. *Animal Reproduction Science*. 138: 1-13
- Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X., Tang, X. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science*. 104(2–4): 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.019>
- Toelihere, M. R. 1993. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa
- Wu, Z., Zheng, X., Luo, Y., Huo, F., Dong, G Zhang, H., Chen, J. 2015. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. *Animal Reproduction Science*. 163: 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.020>
- Yendraliza, Y., Harahap, E.A., Handoko, J., Rodiallah, M., Arman, C. 2020. Quality of Bali bull cryopreserved sperm using different extenders and equilibration times on pregnancy rate of Bali cows. *Songklanakar J. Sci. Technol*. 42(3): 652–659. <https://doi.org/10.14456/sjstpsu.2020.83>
- Yendraliza, Y., Musyirifin, M., Elviradi, E., Zumarni, Z., Rodiallah, M. 2019. Viabilitas Spermatozoa Sapi Bali Menggunakan Pengencer Andromed dengan Penambahan Konsentrasi Sari Wortel yang Berbeda. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis*. 6(2): 239–245. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.33772/jitro.v6i2.5936>
- Yendraliza, Y., Tania, T., Misrianti, R., Zumarni, Z. 2019. Livability and recovery rate of Bali cattle spermatozoa during preservation in tris-based egg yolk diluent with different sucrose level. *Indonesian Journal of Veterinary Sciences*. 13(2): 56–62. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v12i1.5428>