

Penelitian

Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali

(The substitution of glycerol by the pure honey in the cryopreservation of bali bull semen on the post-thawing quality of spermatozoa)

Abdul Malik^{1*}, Rian Fauzi¹, M. Irwan Zakir¹, dan Sakiman²

¹Bagian Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Islam Kalimantan (UNISKA) Muhammad Arsyad Al Banjri, Banjarmasin, Kalimantan Selatan

²Balai Inseminasi Buatan, Banjarbaru Provinsi Kalimantan Selatan

*Penulis Korespondensi: sidol_99@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi substitusi madu asli sebagai pengganti gliserol dalam proses pembekuan pada kualitas spermatozoa pasca-thawing pada sapi bali. Sebanyak empat ekor sapi bali dengan umur sekitar 4 tahun bobot badan 600-650 kg digunakan dalam penelitian ini. Substitusi madu asli pengganti gliserol dilakukan secara bertahap pada pengencer utama skim, kuning telur, dan glukosa. Perlakuan terdiri atas 6 yang terdiri atas level substitusi gliserol dengan madu asli, yaitu: 8% gliserol + 0% madu (M₀); 7% gliserol+1% madu (M₁); 5% gliserol + 3% madu (M₂); 3% gliserol +5%madu (M₃); gliserol 1% + madu 7% (M₄); dan 0% gliserol + 8% madu (M₅). Parameter yang diamati meliputi viabilitas, motilitas, dan abnormalitas spermatozoa pasca-thawing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase viabilitas dan motilitas spermatozoa pasca-thawing tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antara penggunaan gliserol dengan madu sebagai krioprotektan. Sementara itu, rata-rata persentase abnormalitas pasca-thawing menunjukkan perbedaan nyata ($P<0,05$) antara dosis pemberian krioprotektan 8% gliserol dengan semua perlakuan. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan madu pengganti gliserol sebagai krioprotektan pada pengencer skim kuning telur dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi bali.

Kata kunci: madu asli, spermatozoa, viabilitas, motilitas, dan abnormalitas

ABSTRACT

The objective of the present study was to study the effect of substitution of glycerol with pure honey in the semen cryopreservation on the after thawing quality of spermatozoa. Four bali bull cattle with an average body weight of 600-650 kg and aged approximately four years were used in the study. The substitution of glycerol with pure honey was conducted gradually from 0% to 8%. The treatment was the substitution of glycerol by pure honey consisted of 6 levels, i.e., 8% glycerol + 0% pure honey (M₀); 7% glycerol + 1% pure honey (M₁); 5% glycerol + 3% pure honey (M₂); 3% glycerol + 5% pure honey (M₃); 1% glycerol + 7% pure honey (M₄). and 0% glycerol + 8% pure honey (M₅). Parameters measured were the qualities of spermatozoa after thawing the frozen semen including percentage of viability, motility, and abnormality. The result showed that sperm viability and motility were not significantly different ($P>0.05$) by substituting glycerol with pure honey as a cryoprotectant. However, the percentage of sperm abnormality was significantly higher ($P<0.05$) when glycerol was substituted with pure honey. Based on the results of the study, it was concluded that the use of honey as a substitute for glycerol can be used as a cryoprotectant.

Keywords: original honey, spermatozoa, viability, motility, and post-thawed abnormality

PENDAHULUAN

Sapi bali merupakan sapi asli Indonesia yang perkembangannya tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Salah satu teknologi yang telah digunakan untuk perkembangbiakan sapi adalah Inseminasi Buatan (IB). Faktor penting yang menentukan dalam keberhasilan IB adalah kualitas spermatozoa pasca-thawing. Sementara itu, kualitas spermatozoa pasca-thawing dipengaruhi beberapa faktor di antaranya adalah bahan pengencer, proses pembekuan, dan pemberian gliserol dalam proses pembekuan (Toelihere, 1993).

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati, 2000). Menurut Toelihere (1993) penggunaan bahan pengencer semen harus dapat mempertahankan viabilitas spermatozoa sebelum digunakan pada waktunya. Syarat bahan pengencer adalah harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa selama penyimpanan, dapat memungkinkan spermatozoa bergerak secara progresif, tidak bersifat racun, menjadi penyangga, melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*cold shock*) pada saat proses pembekuan semen. Mayoritas kerusakan spermatozoa terjadi pada saat pembekuan akibat adanya pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) yang dapat merusak membran plasma sel yang berakibat pada kematian spermatozoa. Pada saat pembekuan, spermatozoa mengalami penurunan kualitas sekitar 10-40% hingga 50% (Parish, 2003). Untuk meminimalkan kerusakan sel dapat dilakukan penambahan zat tertentu ke dalam pengencer semen (Fitriati, 2008). Zat tersebut dikenal dengan nama krioprotektan. Salah satu jenis krioprotektan yang sering digunakan pada proses pembekuan semen adalah gliserol.

Dosis penambahan gliserol pada beberapa pengencer berbeda-beda. Menurut Evan dan Maxwell (1987) untuk melakukan pembekuan semen, standar penggunaan gliserol yang dianjurkan adalah 6%-8%. Jika kurang dari dosis tersebut, maka gliserol tidak akan memberikan efek yang berarti, sedangkan jika lebih tinggi akan menimbulkan efek toksik pada spermatozoa. Menurut Mumu (2009) penambahan gliserol 3%, 5%, dan 7% masih dapat melindungi spermatozoa selama proses pembekuan pada sapi Bali. Adanya variasi penambahan gliserol tersebut menunjukkan bahwa dosis penggunaan gliserol masih memungkinkan untuk disubstitusi dengan jenis krioprotektan lainnya. Krioprotektan secara umum dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yakni agen penetrasi dan agen nonpenetrasi membran

plasma (Lemma, 2011). Salah satu krioprotektan yang nonpenetrasi adalah gula sederhana yang membentuk konsentrasi ekstraseluler yang seimbang dengan mengubah gradien osmotik dari pengencer sperma dan memungkinkan air dari spermatozoa untuk berdifusi keluar (Fuller, 2004). Salah satu bahan yang diharapkan dapat menjadi alternatif untuk krioprotektan adalah madu. Madu dengan berbagai kandungan nutrisi yang lengkap seperti energi berupa gula sederhana (monosakarida) antara lain fruktosa dan glukosa dibutuhkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi dan krioprotektan nonpenetrasi selama proses pembekuan (Fuller, 2004).

Penambahan fruktosa atau glukosa dalam pengencer berguna untuk mendukung daya hidup spermatozoa pascapengenceran. Proses pembentukan Adenosin Trifosfat (ATP) dan Adenosin Difosfat (ADP) harus terus dilakukan agar motilitas dapat terus berlangsung. Berdasarkan data dari *United States Department of Agriculture (USDA)*, madu mengandung 38% fruktosa dengan 31% glukosa; 17,1% air; 7,2% maltose; 4,2% trisakarida, dan beberapa polisakarida, 1,5% sukrosa, 0,5% mineral, vitamin, dan enzim. Penggunaan madu sebagai krioprotektan dalam proses pembekuan spermatozoa manusia dan kambing dapat meningkatkan kualitas pasca-thawing (Olayeni et al., 2014; Fakhridin dan Alsaadi, 2014)). Berdasarkan alasan di atas maka perlu kiranya dilakukan penelitian mengenai potensi madu sebagai pengganti gliserol dalam proses pembekuan semen beku pada sapi bali. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi substitusi madu asli sebagai pengganti gliserol dalam proses pembekuan pada kualitas semen sapi bali setelah thawing.

BAHAN DAN METODE

Sebanyak empat ekor sapi bali jantan umur sekitar 4 tahun dengan berat badan berkisar antara 600-650 kg digunakan dalam penelitian ini. Kegiatan penelitian ini dilaksanakan di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Provinsi Kalimantan Selatan di Banjarbaru. Koleksi semen pada masing-masing pejantan dilakukan sekali dalam satu minggu selama dua bulan menggunakan vagina buatan.

Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis segera dilakukan setelah pengambilan semen. Pemeriksaan makroskopis yang dilakukan meliputi volume, warna, kekentalan, pH, dan bau. Pemeriksaan mikroskopis yang dilakukan meliputi konsentrasi, viabilitas (daya hidup), motilitas, dan abnormalitas. Bahan pengencer utama yang

digunakan dalam penelitian ini adalah skim, kuning telur, glukosa, dan gliserol (sebagai perlakuan) dengan penambahan antibiotik (sesuai SOP BIB Banjarbaru). Konsentrasi madu asli dari Banjarbaru yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10% yakni 1 ml madu asli dan 9 ml distilled water mengadopsi dari Reda et al. (2014).

Tahapan Penelitian

Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi efek substitusi madu sebagai krioprotektan pengganti gliserol. Dalam penelitian ini penggunaan madu pada proses pembekuan semen dilakukan dengan cara substitusi dengan gliserol. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 perlakuan yang masing-masing perlakuan diulang sebanyak 4x ulangan. Perlakuan pertama (M_0) gliserol 8%, kedua (M_1) gliserol 7% + madu 1%, ketiga (M_2) gliserol 5% + madu 3%, ke empat (M_3) gliserol 3% + madu 5%, ke lima (M_4) pemberian gliserol 1% + madu 7%, dan perlakuan ke enam (M_5) adalah madu sebanyak 8%.

Metode pembekuan semen dibuat dengan dosis per straw minitub (0,25 mL) dengan konsentrasi 100×10^6 spermatozoa/mL. Kemudian straw yang berisi semen diekuilibrasikan pada lemari es pada temperatur $4-5^\circ\text{C}$ selama empat jam. Setelah ekuilibrasikan, semen dalam straw diletakkan pada rak pembekuan dengan jarak 3 cm di atas permukaan uap nitrogen (N_2) cair selama 10 menit dengan menggunakan kotak styrofoam. Semen beku tersebut disimpan dalam kontainer N_2 cair (-196°C) selama satu minggu kemudian dithawing untuk dievaluasi viabilitas, motilitas, dan abnormalitas.

Evaluasi Spermatozoa

Pemeriksaan viabilitas menggunakan eosin-negrosin dengan tahapan sebagai berikut: pewarna eosin-nigrosin dipersiapkan pada suhu sekitar 37°C selama 15 menit dan straw dithawing pada *water bath* dengan suhu $37-38^\circ\text{C}$ selama 30 detik. Kemudian straw dipotong pada bagian tengah, ditetaskan satu tetes semen pada bagian pinggir *gelas objek*. Lalu ditetaskan Eosin-Negrosin 2-3 tetes di samping semen, kemudian diratakan dengan ose sampai homogen. Preparat ulas tipis dibuat dengan menempelkan ujung *gelas objek* lain pada campuran tersebut dengan sudut kemiringan 45° dan didorong sepanjang *gelas objek* hingga diperoleh selapis semen yang difiksasi. Objek diamati di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x. Persentase spermatozoa hidup dan mati dihitung dari 10 lapang

pandang yang berbeda atau sampai jumlah spermatozoa yang dihitung mencapai 200 sel. Spermatozoa yang mati permiabilitas membrannya meningkat atau menyerap warna, sedangkan spermatozoa yang hidup tidak menyerap warna. Sel spermatozoa yang tidak menyerap warna akan berwarna jernih, sedangkan sel spermatozoa yang mati akan berwarna sesuai warna yang diserap (Tambing dkk., 2001).

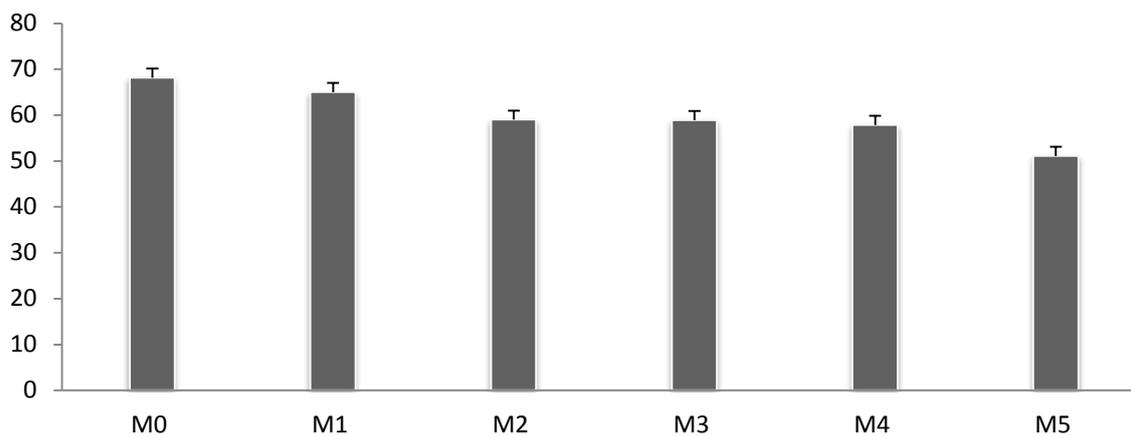
Untuk pemeriksaan motilitas, spermatozoa diambil dari straw yang telah dithawing dengan ose dan diletakkan pada gelas objek dan ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya ditempatkan di atas *slide warmer* suhu 37°C dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 400x (Padilla dan Foote, 1991; Bayemi et al. 2010). Motilitas spermatozoa dihitung dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang bergerak maju dalam satu bidang pandang (Hafez et al., 2000). Perhitungan dilakukan sebanyak 10 kali yang kemudian diambil rata-rata. Pemeriksaan abnormalitas dilakukan sekaligus dengan pengamatan viabilitas, yaitu dengan menghitung jumlah spermatozoa normal dan abnormal kemudian menentukan persentasenya.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ditabulasi dan dilakukan uji homogenitas, kemudian dilakukan analisis ragam dengan menggunakan uji F pada taraf 5%. Jika hasil analisis ragam menunjukkan berpengaruh, maka dilanjutkan dengan uji wilayah berganda Duncan (DMRT).

HASIL

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemeriksaan semen segar dari masing-masing pejantan menunjukkan rata-rata volume, pH, motilitas, konsentrasi, viabilitas, dan abnormalitas hasilnya adalah standar sesuai dengan parameter normal pada sapi pejantan (Gambar 1). Kualitas sperma pasca-thawing merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan keberhasilan fertilisasi pada ternak sapi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase viabilitas dan motilitas sperma pasca thawing tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) antara penggunaan gliserol dan madu sebagai krioprotektan pada semua perlakuan (M_0 , M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , dan M_5). Rata-rata persentase abnormalitas pasca thawing menunjukkan terdapat perbedaan ($P < 0,05$) antara dosis pemberian krioprotektan full gliserol dengan semua perlakuan.



Gambar 1 Rata-rata persentase viabilitas sperma pasca-thawing pada semua perlakuan

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian antara pemeriksaan semen segar dan pasca-thawing pada berbagai perlakuan mengenai viabilitas, motilitas, dan abnormalitas menunjukkan bahwa rata-rata hasilnya menurun antara semen segar (sebelum pembekuan) dan sesudah pembekuan. Hasil persentase viabilitas pada spermatozoa segar dari $82,19 \pm 1,41\%$ menjadi 60% pada rata-rata semua perlakuan. Persentase motilitas spermatozoa segar dari $76,63 \pm 3,21\%$ menjadi $49,84\%$ pada rata-rata semua perlakuan, dan persentase abnormalitas spermatozoa segar dari $7,35 \pm 0,16$ (Tabel 1) menjadi $25,68\%$. Penurunan viabilitas, motilitas, dan abnormalitas tersebut disebabkan karena adanya berbagai proses yang terjadi pada spermatozoa tersebut, antara lain proses pembekuan dan *thawing* setelah pembekuan. Hal tersebut didukung oleh Haugana et al. (2007) dan Hong et al. (2000) yang menyatakan bahwa penyebab utama penurunan kualitas spermatozoa seperti viabilitas, motilitas, dan abnormalitas adalah adanya proses pembekuan dan *thawing* atau pencairan kembali setelah sperma dibekukan.

Viabilitas *pasca-thawing* merupakan faktor penting dalam menentukan tingkat keberhasilan IB. Analisis ragam menunjukkan bahwa

perlakuan penggunaan madu pengganti gliserol sebagai krioprotektan berpengaruh tidak nyata pada rata-rata viabilitas spermatozoa pada semua perlakuan. Meski tidak berpengaruh pada semua perlakuan namun terdapat tren penurunan viabilitas sperma seiring dengan pengurangan dosis gliserol dan penambahan dosis madu untuk krioprotektan (Gambar 1). Hasil tersebut setidaknya selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Olayeni et al. (2011) yang menyatakan bahwa penambahan madu dalam pengencer kuning telur dapat meningkatkan motilitas, persentase hidup mati dan viabilitas spermatozoa kambing *pasca-thawing*. Adanya variasi terhadap hasil penelitian tersebut di duga karena adanya perbedaan basik pengencer yang digunakan. Di sisi lain hasil penelitian Fakhrudin dan Alsaadi (2014) juga menyatakan bahwa pemberian sekitar 10% madu untuk krioprotektan dapat meningkatkan kualitas sperma manusia *pasca-thawing*. Mekanisme kerja gliserol dengan berdifusi ke dalam sel spermatozoa dan dapat dimetabolisir dalam proses-proses yang menghasilkan energi dan membentuk fruktosa, yang juga terdapat pada kandungan nutrisi dalam madu sehingga bisa menggantikan fungsi gliserol meski belum sempurna pada penelitian ini.

Tabel 1 Hasil pemeriksaan semen segar pada masing masing sapi bali setelah pengambilan semen

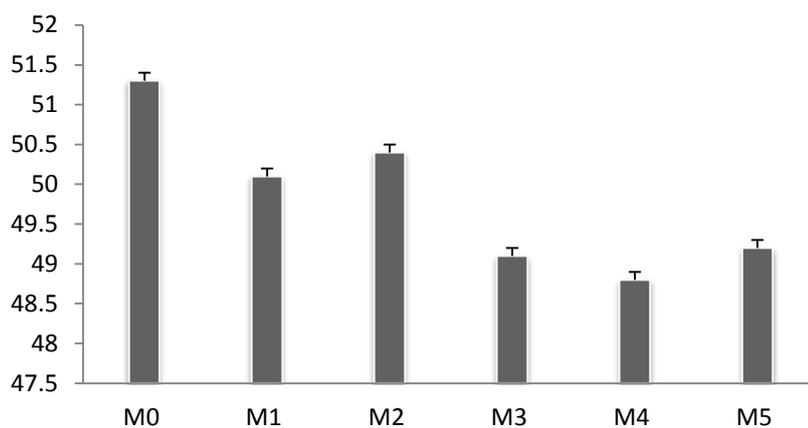
Parameter	Rata-rata
Volume (mL)	$6,10 \pm 1,1$
pH	$6,53 \pm 0,15$
Motilitas (%)	$76,63 \pm 3,21$
Konsentrasi (million)	$910,33 \times 10^6$
Abnormalitas spermatozoa (%)	$8,35 \pm 0,16$
Viabilitas (%)	$82,19 \pm 1,41$

Indikator utama yang sering digunakan dalam menilai salah satu kualitas spermatozoa adalah motilitas. Motilitas spermatozoa merupakan salah satu faktor penting dalam evaluasi pejantan yang akan digunakan sebagai pejantan (Malik et al., 2016). Hal ini penting mengingat sperma yang baik harus menunjukkan motilitas yang tinggi karena deposit sperma pada saat terjadi perkawinan dan IB masih relatif jauh dari tempat pembuahan. Berdasarkan analisis ragam, diketahui bahwa perlakuan penggunaan madu sebagai pengganti gliserol berpengaruh tidak nyata pada rata-rata motilitas spermatozoa. Persentase motilitas pada masing-masing perlakuan Mo, M1, M2, M3, M4, dan M5 secara berturut-turut adalah $51,36 \pm 1,3\%$, $50,13 \pm 0,4\%$, $50,42 \pm 2,3\%$, $49,09 \pm 0,6\%$, $48,82 \pm 1,6\%$, dan $49,25 \pm 1,3\%$, seperti disajikan pada Gambar 2.

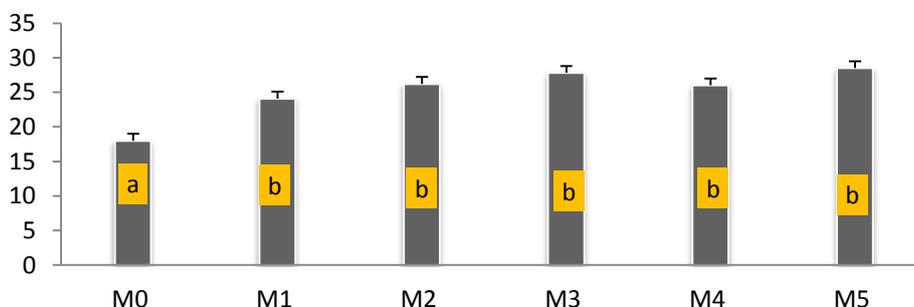
Hasil data tersebut menunjukkan bahwa selisih motilitas antara penggunaan full gliserol dan full madu sebagai krioprotektan dalam proses pembekuan spermatozoa tidak berbeda. Artinya penggunaan madu sebagai krioprotektan pengganti gliserol bisa dilakukan. Hal tersebut terkait dengan kandungan madu yang kaya akan nutrisi seperti

fruktosa, glukosa, serta sukrosa akan mampu melindungi sperma selama proses pembekuan sehingga akan berdampak pada kualitas *pasca-thawing*. Hal ini sesuai dengan pendapat Fuller (2004) bahwa gula sederhana yang terkandung dalam madu bertindak sebagai krioprotektan dengan cara mengubah gradien osmotik spermatozoa diperpanjang dan memungkinkan kadar air dari spermatozoa menyebar. Di sisi lain Hu et al. (2008) yang menyatakan bahwa sukrosa berperan aktif saat sebelum dan setelah proses pembekuan sehingga mempunyai efek yang baik bagi motilitas spermatozoa baik sebelum maupun setelah proses pembekuan.

Pada penelitian ini, salah satu parameter yang dievaluasi adalah abnormalitas spermatozoa *pasca-thawing*. Abnormalitas spermatozoa sangat penting karena akan berpengaruh pada fertilitas. Analisis ragam menunjukkan bahwa penggunaan madu sebagai krioprotektan pengganti gliserol berdampak pada peningkatan persentase abnormalitas spermatozoa *pasca-thawing* yaitu sebesar $18,18 \pm 0,3$, $24,17 \pm 1,6\%$, $26,25 \pm 1,1\%$, $27,83 \pm 0,6\%$, $26,02 \pm 2,1\%$, dan $28,50 \pm 1,6\%$, secara berturut-turut untuk Mo, M1, M2, M3, M4, dan M5, seperti terlihat pada Gambar 3.



Gambar 2 Rata-rata persentase motilitas sperma *pasca-thawing* pada semua perlakuan



Gambar 3 Rata-rata persentase abnormalitas sperma *pasca-thawing* pada semua perlakuan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa pasca-thawing pada perlakuan full gliserol sebesar $18,18 \pm 0,3\%$ mengalami peningkatan menjadi $28,50 \pm 1,6\%$ pada perlakuan full madu. Hasil tersebut juga lebih tinggi abnormalitasnya dari pada yang didapatkan oleh Bezerra et al. (2011), yakni $23,90 \pm 1,70\%$, begitu pula jika dibandingkan dengan penelitian Garner & Hafez (2000) yang menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa jumlahnya tidak melebihi 20% dari total spermatozoa agar tidak memengaruhi fertilitas.

Bila dilihat dari proses kejadian abnormalitas spermatozoa, maka proses kejadian tersebut dapat dikelompokkan menjadi tiga tahapan, yakni tahap abnormalitas primer, sekunder, dan tersier (Hafez et al., 2000; Parkinson, 2004). Abnormalitas primer terjadi pada saat proses spermatogenesis dalam testis, abnormalitas sekunder terjadi selama perjalanan spermatozoa di epididimis, sedangkan abnormalitas spermatozoa tersier terjadi pada kerusakan spermatozoa yang disebabkan selama atau setelah ejakulasi atau dari penanganan yang salah saat inseminasi (Hafez et al., 2000). Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata abnormalitas semen segar adalah sekitar $8,35 \pm 0,16\%$ kemudian mengalami peningkatan sampai pada rata-rata 25%. Kenaikan abnormalitas hampir tiga kali lipat ini terjadi pada saat setelah pengambilan semen atau pada tahap abnormalitas tersier, dan hal tersebut sesuai dengan pendapat Utami (2014) bahwa abnormalitas tersier kemungkinan bisa terjadi karena pengaruh penanganan, proses pembekuan yang mengakibatkan cekaman dingin/*cold shock*, dan pencairan kembali spermatozoa (*thawing*) saat mau digunakan. Namun fenomena yang terjadi ialah hasil penelitian ini menunjukkan kenaikan abnormalitas seiring dengan pengurangan jumlah gliserol pada setiap perlakuan. Hal tersebut diduga karena dari rendahnya dosis gliserol sebagai krioprotektan dalam pembekuan sehingga menyebabkan pecahnya membran yang dapat menyebabkan stres osmotik, perubahan membran, dan perubahan dalam mikrotubulus ekor spermatozoa.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa penggunaan madu pengganti gliserol sebagai krioprotektan pada pengencer skim kuning dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi bali.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada kepala Balai Inseminasi Buatan Provinsi Kalimantan Selatan beserta staf.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

DAFTAR PUSTAKA

- Bayemi PH, Leinyuy I, Nsongka VM, Webb EC, Ebangi AL. 2010. Viability of cattle sperm under different storage conditions in Cameroon. *Tropical Animal Health Production* 42(8):1779-1783.
- Bezerra FSB, Castelo TS, Alves HM, Oliveira IRS, Lima GL, Peixoto GCX, Bezerra ACS, Silva AR. 2011. Objective assessment of the cryoprotective effects of dimethylformamide for freezing goat semen. *Cryobiology* 63:263-266.
- Fakhrildin MB, Alsaadi RA. 2014. Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *Journal of Family Planning and Reproductive Health* 8(1): 27-31.
- Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididymis sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-50 C. *Journal Animal Production* 10 (1) : 22-29.
- Fuller BJ. 2004. Cryoprotectants: the essential anti freezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 25(6): 375-88.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed Hafez/ ESE Hafez. Lippincott Williams and Wilkins. USA. p. 96-109.
- Hafez B, Bellin ME, Varner DD, Love CC, Lenz RW, Didion BA, Dally M, Ax RL. 2000. Semen Evaluation. In: *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lea dan febiger. Philadelphia, USA.
- Haugana T, Grohn YT, Kommisrud E, Ropstad E, Reksen O. 2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science* 97:1-11.
- Hong JHU, Wang QLI, Chen YL, Jlang ZL, Jia YH, LQ W, Ou BB. 2000. Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integ-

- rity in bull semen. *Turkish Journal Veterinary and Animal Science* 35: 379 - 384.
- Hu JM, Xu CY, Li Y, Lu SM, Wang L, Chen ZJ. 2008. Effect of two different cryoprotectant on the motility of post thaw human sperm. *National journal of andrology* 14:23-25.
- Lemma A. 2011. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: M Manafi (ed), *Artificial Insemination in Farm Animals*. Published online by In Tech, pp. 191-216.
- Malik A, Yayan M, Irwan Zakir, Syarif Djaya. 2016. Effects of Addition of Juice Date Palm to the Extender on the Semen Qualities of Frozen Thawed in Bull Spermatozoa, *Global Veterinaria* 16 (1):100-104.
- Evans, G. dan W.M.C, Maxwell 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths, Australia.
- Mumu IM. 2009. Viabilitas semen sapi Simmental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *J Agroland* 16 (2): 172-179.
- Olayemi FO, Adenigi DA, Oyeyemi MO. 2011. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Global Veterinaria* 7(1): 19-21.
- Padilla AW and Foote RH. 1991. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion. *Journal Animal Science* 69(8):3308-3313.
- Parkinson TJ. 2004. Review: Evaluation of Fertility and Infertility in natural service bulls. *Veterinary Journal* 168: 215-229.
- Parrish J. 2003. *Techniques in Domestic Animal Reproduction-Evaluation and Freezing of semen*. <http://www.wisc.edu/anscirepro/>.
- Reda I, El-Sheshtawy, Walid S, El-Nattat, Hussein A, Sabra and Amal Ali H. 2014. Effect of Honey Solution on Semen Preservability of Local Breeds of Cattle Bulls. *World Applied Sciences Journal* 32 (10): 2076-2078.
- Susilawati, T., 2000. *Teknologi Preservasi dan Kriopreservasi Spermatozoa dan Ova*. Tesis. Program Pasca Sarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang
- Tambing S N, Toelihere MR, Yusuf TL, dan IK Utama. 2000. Pengaruh Gliserol dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 (2): 84-99.
- Toelihere M. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
- Utami T, dan Tarsisius Considus Tophianong. 2014. Pengaruh Suhu Thawing pada Kualitas Spermatozoa Sapi Pejantan Friesian Holstein. *Jurnal sains veteriner* 32 (1):32-39.