

Karakteristik Spermatozoa Domba yang Diinkubasi Dalam Medium Fertilisasi dengan Waktu dan Konsentrasi Berbeda

(Characteristics of Sheep Spermatozoa Incubated in Fertilization Medium with Different Time and Concentration)

Hariono¹, Mokhamad Fakhru Ulum^{1,2}, Ekayanti Mulyawati Kaiin³, Ni Wayan Kurniani Karja^{1,2*}

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana

²Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor

³Pusat Riset Zoologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Cibinong, Indonesia

*Penulis untuk korespondensi : karjanwk@gmail.com

Diterima 15 Juli 2022, Disetujui 14 Oktober 2022

ABSTRAK

Keberhasilan fertilisasi *in vitro* tidak hanya dipengaruhi oleh oosit tetapi juga kualitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa, dan lamanya waktu inkubasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi karakteristik spermatozoa domba *post-thawed* yang diinkubasi pada waktu dan konsentrasi yang berbeda dalam medium fertilisasi. Spermatozoa domba berasal dari semen beku domba garut dan ekor gemuk. Konsentrasi spermatozoa yang digunakan adalah 1 dan 5 juta spermatozoa/mL. Setiap kelompok spermatozoa diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C selama 0, 3, dan 6 jam. Setiap akhir masa inkubasi, spermatozoa dievaluasi pola gerak, motilitas, MPU, dan TAU sebanyak tiga ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas total, motilitas progresif, MPU, dan TAU pada kedua bangsa domba dengan konsentrasi 1 dan 5 juta menurun secara signifikan dengan bertambahnya waktu inkubasi. Pola pergerakan spermatozoa kedua bangsa domba pada konsentrasi 1 juta menunjukkan hiperaktivitas pada jam ke 3 inkubasi dengan nilai STR 0,47-0,49% dan nilai LIN 0,33-0,34%, sedangkan pada konsentrasi 5 juta menunjukkan adanya hiperaktivitas pada jam ke 6 inkubasi dengan nilai STR 0,69-0,80% dan nilai LIN 0,52-0,55%. Selama inkubasi, spermatozoa menunjukkan pola renang sedang dengan nilai VCL 50,70-77,85 µ/s. Penelitian ini menyimpulkan bahwa kualitas spermatozoa setelah inkubasi menurun seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Spermatozoa dengan konsentrasi 5 juta menunjukkan nilai motilitas total yang tinggi tetapi nilai progresifnya lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi 1 juta. Hiperaktivitas spermatozoa dengan konsentrasi 1 juta dapat terjadi pada jam ke 3 sedangkan konsentrasi 5 juta dapat terjadi pada jam ke 6 waktu inkubasi.

Kata kunci: domba, inkubasi, *post-thawed*, spermatozoa, konsentrasi

ABSTRACT

The success of *in vitro* fertilization is not only influenced by the oocyte but also by the quality of the spermatozoa, the concentration of spermatozoa, and the length of incubation time. This study aimed to evaluate the characteristics of *post-thawed* sheep spermatozoa incubated at different times and concentrations in a fertilization medium. The sheep spermatozoa were derived from frozen semen of garut and ekor gemuk sheep. Spermatozoa concentrations used were 1 and 5 million spermatozoa/mL. Each group of spermatozoa was incubated in a 5% CO₂ incubator at 38,5°C for 0, 3, and 6 hours. At the end of each incubation period, the spermatozoa were evaluated for movement patterns, motility, MPU, and TAU for three replications. The results showed that total motility, progressive motility, MPU, and TAU in both breeds of sheep with concentrations of 1 and 5 million decreased significantly with increasing incubation time. The movement pattern of the spermatozoa of the two breeds of sheep at a concentration of 1 million showed hyperactivity at the 3rd hour of incubation with an STR value of 0.47-0.49% and a LIN value of 0.33-0.34%, while at a concentration of 5 million showed hyperactivity at an hour to 6 incubations with STR values of 0.69-0.80% and LIN values of 0.52-0.55%. During incubation, spermatozoa showed a moderate swimming pattern with a VCL value of 50.70-77.85 µ/s. This study concluded that the quality of spermatozoa after incubation decreased with increasing incubation time. Spermatozoa with a concentration of 5 million showed a high total motility value but the progressive value was lower than the concentration of 1 million. Spermatozoa hyperactivity with a concentration of 1 million can occur at 3 hours while a concentration of 5 million can occur at 6 hours of incubation.

Keywords: sheep, incubation, *post-thawed*, spermatozoa, concentration

PENDAHULUAN

Domba merupakan salah satu komoditas ternak potong yang potensial karena perkembangannya relatif lebih cepat dibandingkan dengan ternak ruminansia besar. Keunggulan ternak domba adalah mampu beradaptasi di negara tropis seperti Indonesia. *Food and Agriculture Organization (2004)* menyatakan bahwa ada tiga jenis domba yang berkembang di Indonesia yaitu domba garut, domba ekor tipis (DET) dan domba ekor gemuk (DEG). Menurut Heriyadi *et al.* (2012) bahwa domba garut ialah domba tipe pedaging yang diyakini berasal dari domba lokal asli Garut, sedangkan domba ekor gemuk (DEG) adalah salah satu domba plasma nutfah Indonesia yang juga termasuk domba tipe pedaging sehingga sangat potensial untuk dikembangkan sebagai salah satu ternak penyuplai daging nasional. Pada tahun 2019 Data Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan-Kementerian Pertanian menunjukkan bahwa tingkat pemotongan ternak domba meningkat dari 2.032.927 ekor menjadi 2.039.099 ekor. Adanya peningkatan tersebut akan berdampak pada penurunan populasi domba. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi ternak domba adalah dengan memanfaatkan bioteknologi reproduksi seperti produksi embrio *in vitro* (PEIV).

Fertilisasi *in vitro* merupakan salah satu tahapan dari proses produksi embrio *in vitro*. Teknologi tersebut dapat digunakan sebagai upaya penyelamatan materi genetik dengan memanfaatkan ovarium yang selama ini hanya menjadi bahan ikutan atau limbah dari rumah potong hewan (RPH) sehingga dapat meningkatkan nilai gunanya (Febretrisiana *et al.*, 2015). Kendala utama yang sedang dihadapi dalam produksi embrio *in vitro* yaitu rendahnya tingkat fertilisasi. Tingkat fertilisasi *in vitro* hanya sampai dalam kisaran 13-53% (Muttaqin *et al.*, 2015; Aini *et al.*, 2016). Kajian semen beku domba terhadap tingkat fertilisasi secara *in vitro* juga telah dilaporkan oleh (Karja *et al.*, 2013; Pamungkas *et al.*, 2017). Namun demikian masih jarang dilakukan kajian terhadap kualitas semen beku domba dalam medium fertilisasi untuk tujuan produksi embrio secara *in vitro*. Keberhasilan fertilisasi secara *in vitro* tidak hanya dipengaruhi oleh oosit tetapi juga oleh spermatozoa yang digunakan untuk membuahnya (Triwulanningsih *et al.*, 2002), jumlah konsentrasi spermatozoa yang digunakan pada saat fertilisasi (Saeki *et al.*, 1994) serta lama waktu inkubasi fertilisasi (Kusindarta, 2009). Spermatozoa mamalia yang diejakulasikan secara struktural telah sempurna, namun masih belum mempunyai kemampuan untuk melakukan fertilisasi pada oosit. Spermatozoa agar berhasil melakukan fertilisasi memerlukan proses kapasitasi.

Kapasitasi adalah persiapan atau perubahan fisiologik spermatozoa di dalam saluran kelamin betina atau dalam medium fertilisasi untuk mempertinggi daya fertilisasinya. Perubahan yang terjadi pada spermatozoa selama proses kapasitasi yaitu mencakup induksi motilitas hiperaktif, reaksi akrosom yang berakhir dengan pelepasan enzim *hyaluronidase* (Dzulfiqor, 2018). Beberapa peneliti juga telah melaporkan bahwa rendahnya tingkat fertilisasi dapat disebabkan oleh beberapa faktor selama fertilisasi *in vitro* misalnya spermatozoa tidak dapat membuahi oosit karena tidak mengalami hiperaktivasi motilitas (Baker *et al.*, 2009), rendahnya persentase kapasitasi dan terjadi reaksi akrosom spontan (Coy & Romar, 2002). Waktu yang diperlukan untuk kapasitasi bervariasi dari setiap spesies yang berkisar 1-2 jam pada sapi dan domba (Susilawati, 2011), 1 jam pada tikus dan 6 jam pada manusia (Gwatkin, 1977). Oosit dengan sel-sel kumulus sedikit bisa dilewati spermatozoa dalam waktu singkat, sementara oosit dengan sel-sel kumulus lebih banyak akan dilewati oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama untuk mencapai zona pelusida. Akan tetapi, waktu inkubasi yang terlalu lama akan menyebabkan terjadinya polispermi, sehingga perkembangan embrio tidak dapat berlanjut (Kusindarta 2009). Kapasitasi di luar tubuh (*in vitro*) dapat terjadi karena di dalam medium fertilisasi terdapat zat-zat yang dapat menstimulasi terjadinya kapasitasi serta reaksi akrosom, seperti kafein dan heparin (Susilawati 2011) serta *bovine serum albumin* (BSA), serum membantu kapasitasi spermatozoa melalui pengurangan kolesterol membran spermatozoa (Dow & Bavister, 1989). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi karakteristik spermatozoa domba *post-thawed* yang diinkubasi dalam medium fertilisasi dengan waktu dan konsentrasi berbeda.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Semen beku domba garut dan domba ekor gemuk diperoleh dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, Bandung. Preparasi spermatozoa menggunakan teknik *washing* (Setiadi & Karja, 2013). Semen beku di *thawing* pada suhu 37°C selama 30 detik di dalam waterbath (Memmert) kemudian straw dibuka menggunakan gunting straw. Seluruh isi straw dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril 15 mL (Corning Centristar®) yang berisi 5 mL medium fertilisasi modifikasi dari Suzuki *et al.* (2000), medium kemudian disentrifugasi (Hettich EBA 20, Germany) dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit.

Supernatan kemudian dibuang dan pelet disisakan sekitar 200 μ L. Pelet sel spermatozoa kemudian diencerkan menggunakan medium fertilisasi sampai konsentrasinya menjadi 1 juta dan 5 juta spermatozoa/mL. Setiap kelompok spermatozoa diinkubasi pada inkubator (*Thermo Scientific*) CO₂ 5% pada temperatur 38,5°C selama 0, 3, dan 6 jam. Setiap akhir periode inkubasi, spermatozoa dievaluasi pola gerakan dan motilitas, integritas membran plasma, status akrosom serta abnormalitas. Evaluasi diulang sebanyak 3 kali.

Penilaian Motilitas

Setiap akhir periode inkubasi, motilitas dan pola gerakan VCL (Curve linear velocity), VAP (Average path velocity), VSL (Straight line velocity), LIN (Linearity= VSL/VCL) STR (Straightness= VSL/VAP) dievaluasi menggunakan computer assisted sperm analysis (CASA Sperm Vision™ 3.7 Minitube, Germany), yang dihubungkan dengan mikroskop Zeiss Axio Scope A1. Evaluasi dilakukan dengan cara meneteskan 10 μ L semen di atas gelas objek dan ditutup dengan gelas penutup. Sampel diletakkan pada mikroskop (Zeiss Axio Scope A1) dan analisis dilakukan dari 5 lapang pandang (Amann & Weberski, 2014).

Keutuhan Membran Plasma (MPU)

Keutuhan membran plasma spermatozoa dievaluasi menggunakan *Hypoosmotic Swelling Test* (HOST). Komposisi larutan HOST adalah 0,135 gram fruktosa dan 0,0737 gram tri sodium sitrat 2H₂O (Merck, Germany) dalam 10 mL air mili-Q (Arifiantini et al., 1999). Sampel semen domba dicampur dengan larutan HOST (1:8), dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Setelah diinkubasi, 10 μ L semen ditempatkan pada objek gelas dan ditutup dengan gelas penutup, kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya (Nikon FDX-35) dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai dengan ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan spermatozoa yang rusak ditandai dengan ekor lurus. Jumlah spermatozoa diamati minimal 200 sel pada 10 lapang pandang. Membran plasma utuh dihitung dengan menghitung jumlah spermatozoa dengan membran plasma utuh dibagi dengan total jumlah spermatozoa dikali 100%.

Status Akrosom

Status akrosom diamati dengan pewarnaan *Trypan Blue-Giemsa* (TB-G). Metode pewarnaan ini merujuk pada (Nofa et al. 2016; Kaiin dan Gunawan 2017). Pewarnaan TB-G dimulai dengan meneteskan semen

dan larutan *trypan blue* yang dilarutkan menggunakan NaCl 0,81% secara bersamaan lalu dihomogenkan perlahan, dibuat preparat ulas dan dikeringkan secara vertikal. Preparat diwarnai menggunakan larutan *neutral red* dengan komposisi (86 mL HCl 1,0 N, 14 mL *formaldehyde* 37%, 0,2 g *neutral red*), preparat diwarnai selama 2-5 menit dengan cara meratakan larutan ke permukaan preparat lalu dikeringkan, preparat dibilas menggunakan air mengalir serta dikeringkan kembali. Tahapan pewarnaan berikutnya, preparat direndam dalam *staining jar* yang berisikan larutan *giemsa* 5%, dibiarkan pada suhu ruang selama 3 hari, kemudian dibilas kembali dengan mencelupkan ke dalam wadah berisi air selama 2 menit. Setelah dikeringkan, ulas dihangatkan menggunakan *heating table* dengan suhu 40°C (Kovacs dan Foote, 1992). Spermatozoa dengan tudung akrosom utuh (TAU) berwarna ungu pada bagian kepala sedangkan spermatozoa dengan akrosom yang tidak utuh akan berwarna lavender pucat atau pudar. Status akrosom dihitung dengan menghitung jumlah spermatozoa dengan tudung akrosom utuh dibagi dengan total jumlah spermatozoa dikali 100%.

Analisis Statistik

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) faktorial, bangsa domba, waktu inkubasi serta jumlah konsentrasi dijadikan sebagai faktor perlakuan. Data disajikan dalam bentuk persentase \pm standar deviasi (SD). Data karakteristik spermatozoa diperoleh dari 3 kali ulangan. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf nyata 95%. Jika terdapat adanya perbedaan pada faktor bangsa dan jumlah konsentrasi maka dilanjutkan dengan uji *Independent Sample t-Test*, sementara jika terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan waktu inkubasi maka dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Data tersebut dianalisis menggunakan SPSS versi 24,0.

HASIL

Karakteristik Spermatozoa Domba Post-Thawed

Berdasarkan data pada Tabel 1, persentase *post-thawed* motilitas total, motilitas progresif, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh dan abnormalitas spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk sebelum diinkubasi dalam medium fertilisasi tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

Pola pergerakan spermatozoa *post-thawed* domba garut dan domba ekor gemuk sebelum

Tabel 1. Kualitas spermatozoa domba *post-thawed*

Parameter	Bangsa Domba	
	Garut	Ekor Gemuk
Motilitas Total (%)	56,53±3,56	50,60±2,86
Motilitas Progresif (%)	42,50±2,10	40,37±2,97
Viabilitas (%)	88,76±1,41	89,96±3,40
Abnormal (%)	1,42±1,01	1,83±0,29
Membran Plasma Utuh (%)	88,68±2,38	83,80±2,54
Tudung Akrosom Utuh(%)	85,53±0,82	86,36±3,84

Keterangan: Data dalam bentuk rata-rata persentase ± standar deviasi.

Tabel 2. Pola pergerakan spermatozoa domba *post-thawed* domba

Parameter	Bangsa Domba	
	Garut	Ekor Gemuk
VCL (µm/s)	94,52±6,19 ^a	104,73±1,88 ^b
VAP (µm/s)	62,38±2,39	64,00±0,96
VSL (µm/s)	45,42±1,56 ^a	48,85±0,49 ^b
LIN (%)	0,48±0,02	0,46±0,1
STR (%)	0,72±0,01 ^a	0,76±0,2 ^b
ALH (µm/s)	4,400,18 ^a	4,400,18 ^b

Keterangan: Data dalam bentuk rata-rata persentase±standar deviasi. VCL (*Curve linear velocity*), VAP (*Average path velocity*), VSL (*Straight line velocity*), LIN (*Linearity=VSL/VCL*), STR (*Straightness=VSL/VAP*), ALH (*Amplitudo of lateral head displacement*).

diinkubasi dalam medium fertilisasi ditunjukkan pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel tersebut terlihat bahwa nilai VCL, VSL dan STR pada kedua bangsa domba terdapat perbedaan nyata ($P < 0,05$). Sedangkan untuk parameter VAP dan LIN tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$). *Karakteristik Spermatozoa Domba Setelah Inkubasi*

Motilitas total merupakan salah satu parameter yang secara umum digunakan untuk mengevaluasi semen beku. Berdasarkan Gambar 1, nilai motilitas total domba garut dan domba ekor gemuk pada konsentrasi 1 juta dan 5 juta tidak ditemukan perbedaan nilai motilitas pada kedua bangsa domba. Spermatozoa kedua bangsa domba tersebut terlihat menurun secara signifikan ($P < 0,05$) seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi.

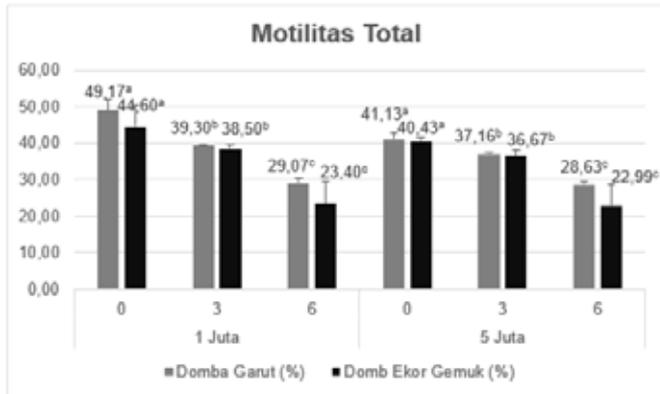
Motilitas progresif merupakan salah satu kriteria penentu kualitas spermatozoa sehingga dapat memasuki kumulusi oophorus dan bergerak di dalamnya untuk dapat mencapai oosit. Nilai motilitas progresif domba garut dan domba ekor gemuk pada konsentrasi 1 juta tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Sedangkan pada konsentrasi 5 juta ditemukan perbedaan nilai motilitas progresif kedua bangsa domba tersebut pada jam ke 0 waktu inkubasi

(Gambar 2). Spermatozoa kedua bangsa domba tersebut terlihat menurun secara signifikan ($P < 0,05$) seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi namun pada konsentrasi 5 motilitas progresif spermatozoa domba garut tidak menunjukkan penurunan yang signifikan ($P > 0,05$).

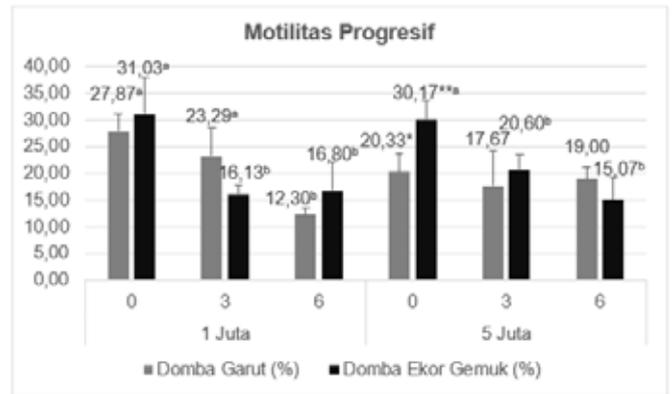
Membran plasma berperan penting dalam mengatur seluruh proses yang terjadi di dalam sel serta melindungi organel-organel yang terdapat dalam sel (Rizal *et al.*, 2005). Persentase keutuhan membran plasma spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk setelah diinkubasi dalam media fertilisasi dapat dilihat pada Gambar 3, tampak keutuhan membran plasma pada kedua bangsa domba dengan penggunaan konsentrasi spermatozoa berbeda tidak ditemukan adanya perbedaan yang nyata ($P > 0,05$). Namun demikian persentase nilai keutuhan membran plasma pada kedua bangsa domba menurun secara signifikan ($P < 0,05$). Penurunan membran plasma utuh kedua bangsa domba dengan konsentrasi 1 juta mulai menurun pada jam ke 6 inkubasi sedangkan penggunaan konsentrasi 5 juta membran plasma utuh mulai menurun secara signifikan pada jam ke 3 waktu inkubasi.

Tudung akrosom merupakan suatu selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi keluaranya materi genetik dan enzim yang berfungsi pada saat fertilisasi. Berdasarkan Gambar 4, persentase tudung akrosom utuh spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk setelah diinkubasi dalam media fertilisasi

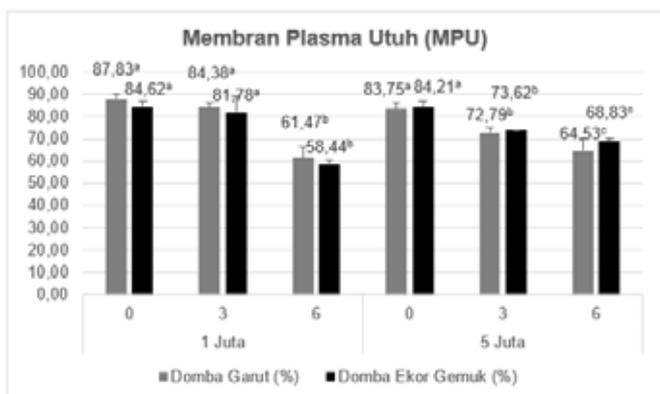
dengan konsentrasi 1 juta tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P>0,05$) namun pada konsentrasi 5 juta kedua bangsa domba tersebut menunjukkan adanya perbedaan pada waktu inkubasi ke 3 dan seiring dengan pertambahan waktu inkubasi persentase tudung akrosom spermatozoa kedua bangsa domba pada konsentrasi 1 juta menurun



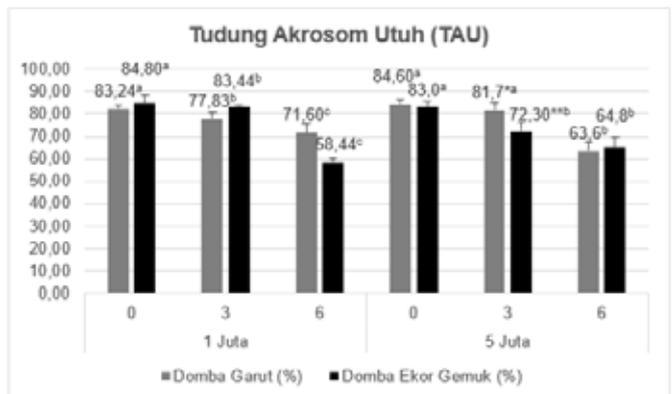
Gambar 1. Motilitas total. Keterangan: Spermatozoa diinkubasi pada medium IVF selama 0 jam (Kelompok 0 jam); 3 jam (Kelompok 3 jam); dan 6 jam (kelompok 6 jam); 1 juta (kelompok 1 juta); (kelompok 5 juta). Huruf (a, b dan c) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar waktu inkubasi pada satu bangsa domba.



Gambar 2. Motilitas Progresif. Keterangan: Spermatozoa diinkubasi pada medium IVF selama 0 jam (Kelompok 0 jam); 3 jam (Kelompok 3 jam); dan 6 jam (kelompok 6 jam); 1 juta (kelompok 1 juta); (kelompok 5 juta). Huruf (a, b dan c) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar waktu inkubasi pada satu bangsa domba. tanda (*) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar bangsa domba pada waktu inkubasi yang sama.



Gambar 3. Membran plasma utuh. Keterangan: Spermatozoa diinkubasi pada medium IVF selama 0 jam (Kelompok 0 jam); 3 jam (Kelompok 3 jam); dan 6 jam (kelompok 6 jam); 1 juta (kelompok 1 juta); (kelompok 5 juta) . Huruf (a, b dan c) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar waktu inkubasi pada satu bangsa domba.



Gambar 4. Tudung akrosom utuh. Keterangan: Spermatozoa diinkubasi pada medium IVF selama 0 jam (Kelompok 0 jam); 3 jam (Kelompok 3 jam); dan 6 jam (kelompok 6 jam); 1 juta (kelompok 1 juta); (kelompok 5 juta) . Huruf (a, b dan c) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar waktu inkubasi pada satu bangsa domba. tanda (*) menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar bangsa domba pada waktu inkubasi yang sama.

Tabel 3. Pola pergerakan spermatozoa setelah inkubasi

Domba	Konsentrasi	Jam	VCL ($\mu\text{m}/\text{S}$)	VAP ($\mu\text{m}/\text{S}$)	VSL ($\mu\text{m}/\text{S}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (%)
Garut	1 Juta	0	58,27 \pm 2,31 ^{*A}	40,19 \pm 1,01 ^a	30,00 \pm 0,49	0,51 \pm 0,03 ^{ab}	0,74 \pm 0,02 ^a	4,12 \pm 0,45
		3	70,83 \pm 2,31 ^A	48,56 \pm 5,10 ^b	24,00 \pm 7,04	0,33 \pm 0,09 ^{aA}	0,49 \pm 0,07 ^{bA}	4,31 \pm 0,49
		6	55,23 \pm 5,16 ^{*A}	40,43 \pm 2,81 ^a	33,32 \pm 1,82 ^A	0,60 \pm 0,08 ^b	0,82 \pm 0,06 ^a	3,88 \pm 0,26
	5 Juta	0	51,38 \pm 1,59 ^{ab}	36,30 \pm 1,38 ^{a*}	29,19 \pm 0,13	0,56 \pm 0,02	0,80 \pm 0,03	3,52 \pm 0,24
		3	63,17 \pm 8,38 ^{bb}	45,14 \pm 6,21 ^{b*}	34,41 \pm 6,87	0,53 \pm 0,09 ^B	0,75 \pm 0,07 ^B	3,71 \pm 0,07
		6	56,08 \pm 2,01 ^{abb}	41,92 \pm 0,88 ^{ab}	29,45 \pm 6,96 ^B	0,52 \pm 0,14	0,69 \pm 0,15	3,27 \pm 0,42
Ekor Gemuk	1 Juta	0	64,26 \pm 6,09 ^{a**}	60,76 \pm 2,81 ^a	44,11 \pm 2,25 ^a	0,46 \pm 0,01 ^a	0,72 \pm 0,04 ^a	4,78 \pm 0,15
		3	77,85 \pm 3,55 ^b	56,85 \pm 2,45 ^{ab}	26,94 \pm 2,93 ^b	0,34 \pm 0,05 ^{bA}	0,47 \pm 0,04 ^b	4,12 \pm 0,45
		6	56,89 \pm 7,22 ^{b**}	39,34 \pm 5,84 ^b	31,88 \pm 7,46 ^b	0,55 \pm 0,11 ^c	0,80 \pm 0,08 ^a	3,44 \pm 0,66
	5 Juta	0	56,95 \pm 3,81	40,49 \pm 0,31 ^{**}	29,98 \pm 1,43	0,52 \pm 0,06	0,73 \pm 0,04 ^{ab}	3,43 \pm 0,59
		3	50,70 \pm 2,11	34,22 \pm 3,97 ^{**}	25,09 \pm 3,94	0,49 \pm 0,07 ^B	0,72 \pm 0,04 ^a	3,15 \pm 0,57
		6	56,94 \pm 3,57	39,08 \pm 4,57	35,04 \pm 9,70	0,55 \pm 0,05	0,80 \pm 0,02 ^b	2,79 \pm 0,37

Keterangan: Data dalam bentuk rata-rata persentase \pm standar deviasi. Keterangan: Spermatozoa diinkubasi pada medium IVF selama 0 jam (Kelompok 0 jam); 3 jam (Kelompok 3 jam); dan 6 jam (kelompok 6 jam); 1 juta (kelompok 1 juta); (kelompok 5 juta); VCL (*Curve linear velocity*); VAP (*Average path velocity*); VSL (*Straight line velocity*); LIN (*Linearity*=VSL/VCL); STR (*Straightness*=VSL/VAP); ALH (*Amplitudo of lateral head displacement*). Huruf (a,b,c) pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan waktu inkubasi ($P < 0,05$) sedangkan Bintang (*) pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap perlakuan bangsa ($P < 0,05$). (A dan B) pada baris yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata pada satu bangsa, waktu inkubasi yang sama dengan konsentrasi berbeda.

secara signifikan pada jam ke 3 inkubasi namun pada konsentrasi 5 juta tudung akrosom domba garut menurun secara signifikan pada jam ke 6 waktu inkubasi dan domba garut menurun secara signifikan pada jam ke 3 waktu inkubasi

Pola pergerakan spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk setelah diinkubasi ditunjukkan pada Tabel 2, parameter VCL dan VAP dengan konsentrasi 1 juta pada kedua bangsa domba tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada waktu inkubasi ke 0 dan ke 6. Sedangkan untuk parameter VSL, STR dan LIN pada kedua bangsa domba tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

PEMBAHASAN

Karakteristik Spermatozoa Domba Post-Thawed

Thawing merupakan pencairan kembali semen atau medium yang mengandung spermatozoa dan plasma semen yang telah dibekukan. Semen yang diproses untuk menjadi semen beku secara umum telah memenuhi syarat yang telah ditetapkan baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Berdasarkan data pada Tabel 1, mengindikasikan

bahwa kualitas spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk memiliki gambaran kualitas dan viabilitas yang sama selama proses pembekuan. Susu skim merupakan bahan pengencer semen beku domba BIB Lembang yang mengandung protein, glukosa, air dan lemak serta dapat digunakan sebagai sumber energi bagi spermatozoa. Susu skim menyediakan zat-zat energi bagi spermatozoa dan ditambahkan dengan bahan lain sebagai penyangga (*buffer*) dan mencegah terjadinya *cold shock* sehingga dapat mempertahankan kualitas spermatozoa semen beku (Utomo dan Sumaryati 2000). Herdis *et al.* (2005) juga menyatakan bahwa salah satu upaya untuk mencegah kerusakan spermatozoa selama proses pembekuan adalah dengan cara pemberian zat krioprotektan yang berfungsi mereduksi kematian spermatozoa selama proses pembekuan yang mengakibatkan pembentukan kristal es ekstraseluler dan intraseluler, sehingga dapat mempertahankan viabilitas sel setelah pembekuan.

Berdasarkan pada Tabel 2, dapat dilihat bahwa pola pergerakan spermatozoa kedua bangsa domba tidak menunjukkan adanya hiperaktifasi, sebagaimana dijelaskan oleh Cancel *et al.* (1996) bahwa rata-rata spermatozoa bergerak hiperaktif apabila menunjukkan nilai $\text{STR} < 0,5$ dan $\text{LIN} < 0,35$.

Hal ini menandakan bahwa sampel semen yang diuji pada penelitian ini telah ditangani secara benar. Toelihere (1985); Hafez (1993) mengemukakan bahwa pemeriksaan dan penilaian semen hanya dapat dilakukan dalam waktu singkat sesudah penampungan pada semen segar dan sesudah *thawing* pada semen beku untuk memperoleh hasil yang memuaskan. Adanya perbedaan yang signifikan pada beberapa parameter pola kinematika spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk diduga disebabkan setiap bangsa domba memiliki perbedaan sifat membran plasma untuk melindungi spermatozoa dalam proses pembekuan. Kriopreservasi dapat mengakibatkan perubahan kualitas semen karena peningkatan stres oksidatif yang dapat menghasilkan perubahan motilitas dan pola pergerakan spermatozoa (Viquez *et al.*, 2020).

Karakteristik Spermatozoa Domba Setelah Inkubasi

Motilitas total merupakan salah satu parameter yang secara umum digunakan untuk mengevaluasi semen beku dan memprediksi fertilitas pada hewan (Chatiza *et al.*, 2012). Berdasarkan Gambar 1, penurunan motilitas ini diduga karena adanya peningkatan aktivitas pergerakan dan metabolisme selama inkubasi. Pergerakan spermatozoa memerlukan energi sedangkan pembentukan energi yang diproduksi oleh spermatozoa di luar tubuhnya sangat terbatas. Selain itu proses metabolisme memproduksi hasil sampingan yaitu berupa asam laktat yang dapat menyebabkan perubahan pH pada medium sekitarnya (Latif *et al.* 2005; Siudzinska dan Lukaszewicz. 2008).

Motilitas progresif diperlukan untuk dapat memasuki kumulus oophorus dan bergerak di dalamnya untuk dapat mencapai oosit (Morrell 2019). Berdasarkan Gambar 2, motilitas progresif pada kedua bangsa menurun seiring dengan penambahan waktu inkubasi, Hal ini sesuai dengan penelitian Zarchi *et al* (2020) yang menyatakan bahwa motilitas progresif spermatozoa akan menurun secara signifikan setelah diinkubasi selama 2 sampai 4 jam pada medium fertilisasi. Penurunan motilitas progresif secara signifikan pada kedua bangsa domba seiring penambahan waktu inkubasi, hal ini diduga karena adanya pengurasan sumber energi selama inkubasi. Ratnawati *et al.* (2017) menyatakan bahwa sumber energi seperti glukosa di dalam medium mempunyai jumlah terbatas. Penurunan konsentrasi glukosa pada medium fertilisasi kemungkinan akan menyebabkan spermatozoa kehilangan motilitas progresif serta viabilitasnya yang disebabkan adanya akumulasi produk seperti asam laktat yang dihasilkan

pada saat proses metabolisme sel (Zarchi *et al.*, 2020). Sedangkan perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 5 juta pada jam ke 0 waktu inkubasi terhadap kedua bangsa domba diduga karena setiap bangsa domba memiliki perbedaan sifat membran plasma untuk melindungi spermatozoa baik dalam proses pembekuan serta berada dalam medium fertilisasi. Selain itu, semakin banyak sel dalam suatu medium maka kebutuhan energi semakin meningkat sehingga dapat meningkatkan intensitas metabolisme sel, yang akhirnya menyebabkan peningkatan konsumsi oksigen pada spermatozoa. Proses metabolisme sel yang terus meningkat akan memproduksi hasil sampingan bagi spermatozoa yaitu berupa asam laktat yang dapat menyebabkan perubahan pH pada medium sekitarnya (Latif *et al.*, 2005; Siudzinska & Lukaszewicz, 2008). Kondisi tersebut menyebabkan perubahan kondisi asam yang bersifat racun bagi spermatozoa (Sugiarti *et al.*, 2004). Sumarsono (1998) juga berpendapat bahwa, spermatozoa sangat peka terhadap perubahan pH medium dari keadaan netral, terutama terhadap pH rendah. Trianan (2006) menambahkan bahwa, semakin banyaknya asam laktat akan menjadi racun bagi kehidupan spermatozoa, akumulasi asam laktat akan menyebabkan perubahan pH sehingga daya tahan spermatozoa berkurang.

Membran plasma berperan penting dalam mengatur seluruh proses yang terjadi di dalam sel serta melindungi organel-organel yang terdapat dalam sel (Rizal *et al.* 2005). Penurunan membran plasma secara signifikan pada kedua bangsa domba seiring dengan penambahan waktu inkubasi ini diduga karena adanya peroksidasi lipid berkepanjangan akibat konsumsi oksigen yang terlalu banyak selama waktu inkubasi. Hal tersebut senada dengan penelitian Anwar *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa konsumsi oksigen yang berlebihan akan menyebabkan kerusakan pada membran plasma serta menyebabkan hilangnya fungsi enzim dan transpor membran.

Tudung akrosom merupakan suatu selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi keluarnya materi genetik dan enzim hyaluronidase. Enzim hyaluronidase mempunyai peranan penting untuk melisis zona pelusida pada sel telur pada saat fertilisasi (Ichwandi, 2004). Berdasarkan data pada Gambar 4, terlihat bahwa persentase tudung akrosom utuh pada kedua bangsa domba menurun secara signifikan seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Penurunan persentase tudung akrosom utuh tersebut menandakan bahwa seiring penambahan waktu inkubasi maka spermatozoa banyak mengalami proses kapasitas. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan

oleh Wattimena (2006) bahwa spermatozoa akan mengalami peningkatan reaksi akrosom seiring dengan lamanya waktu inkubasi, sehingga mengakibatkan lebih banyak spermatozoa yang tidak memiliki akrosom utuh.

Pola Pergerakan Spermatozoa Domba Setelah Inkubasi

Hiperaktivasi (HA) adalah proses yang pada spermatozoa mamalia saat berada dalam saluran reproduksi betina. Hiperaktivasi spermatozoa merupakan bagian dari proses kapasitasi yang ditandai dengan adanya gerakan spermatozoa yang kuat, non-progresif dan non-linier. Selama hiperaktivasi pola dan kekuatan jalur spermatozoa juga mengalami perubahan drastis ditandai dengan pergerakan lateral kepala dan ekor spermatozoa dengan amplitudo lebar (ALH) dan motilitas yang lambat atau tidak progresif, kemudian diikuti oleh reaksi akrosom, dimana pada kepala spermatozoa akan melepaskan enzim untuk tujuan penetrasi oosit dan fertilisasi (Verstegen *et al.*, 2002). Parameter ALH (menggambarkan kemampuan spermatozoa untuk menembus lendir serviks serta sel-sel yang melindungi oosit dengan menunjukkan kekuatan getaran ekor bersama dengan frekuensi rotasi sel yang memungkinkan perkembangan spermatozoa dalam lendir serviks dan selubung oosit (Verstegen *et al.*, 2002). Data pada Tabel 3, mengindikasikan bahwa kelompok spermatozoa dengan konsentrasi 1 juta pada domba garut dan domba ekor gemuk menunjukkan adanya hiperaktivasi pada jam ke 3 waktu inkubasi jika dibandingkan dengan kelompok 5 juta. Simonik *et al.* (2014) menyatakan bahwa sampel spermatozoa dengan konsentrasi yang lebih tinggi akan menunjukkan motilitas total dan kecepatan spermatozoa yang tinggi yang dikarenakan adanya populasi sel yang lebih banyak namun nilai progresifnya lebih rendah. Cancel *et al.* (1996) yang menyatakan bahwa rata-rata spermatozoa bergerak hiperaktif apabila menunjukkan nilai $STR > 0.5$ dan $LIN > 0.35$. Bernecic *et al.* (2019) juga melaporkan bahwa nilai VCL yang tertinggi serta persentase LIN yang rendah dapat menggambarkan spermatozoa mengalami hiperaktivasi. Secara umum, selama inkubasi spermatozoa menunjukkan berenang sedang. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Krázková *et al.* (2017) bahwa nilai VCL dapat dibedakan menjadi: cepat ($> 90 \mu\text{m/s}$), sedang ($45-90 \mu\text{m/s}$), lambat ($10-45 \mu\text{m/s}$) dan statis atau immotil ($< 10 \mu\text{m/s}$).

Tidak terdapat perbedaan pada kualitas spermatozoa domba garut dan domba ekor gemuk terhadap parameter motilitas total, motilitas progresif, membran plasma utuh (MPU) dan tudung

akrosom utuh (TAU) sebelum diinkubasi di dalam media fertilisasi, akan tetapi terdapat perbedaan nyata terhadap pola pergerakan spermatozoa pada parameter VCL, VSL dan STR. Sedangkan setelah inkubasi ditemukan adanya perbedaan nilai motilitas progresif pada konsentrasi 5 juta saat jam ke 0 waktu inkubasi, tudung akrosom utuh (TAU) pada konsentrasi 5 juta saat jam ke 3 inkubasi serta pola pergerakan VCL dan VAP dengan konsentrasi 1 juta saat jam ke 6 inkubasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Laboratorium Fertilisasi (IVF), Divisi Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University dan Laboratorium Pusat Riset Zoologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong yang telah memberikan fasilitas dalam melakukan penelitian dan juga kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

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

DAFTAR PUSTAKA

- [BIB] Balai Inseminasi Buatan Lembang. 2016. Teknis produksi semen beku ternak unggul. Balai Inseminasi Buatan Lembang, Bandung, Indonesia.
- [FAO] Food and Agriculture Organization (FAO) Corporate Document Repository. 2004. Proflic sheep in java. <http://www.fao.org/DOCREP/004/X6517E04>.
- Aini AN, Setiadi MA, Karja NWK. 2016. Kemampuan fertilisasi spermatozoa sexing dan perkembangan awal embrio secara in vitro pada sapi. *J Veteriner* 34 (2): 225–232. DOI: 10.22146/jsv.27562
- Amann RO, Waberski D. 2014. Computer assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1): 5-17. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
- Anwar P, Ondho YS, Samsudewa D. 2015. Kualitas membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa sapi bali dipreservasi suhu 5 °C dalam pengencer ekstrak air tebu dengan penambahan kuning telur. *Agromedia* 33(1): 53–63.
- Arifiantini RI, Purwantara B, Putra WW. Pengujian keutuhan membran plasma spermatozoa semen cair domba menggunakan larutan hipoosmotik. *Prosiding Seminar Hasil-Hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat* 291–299.

- Baker MA, Hetherington L, Curry B, Aitken RJ. 2009. Phosphorylation and consequent stimulation of the tyrosine kinase C-Abl by PKA in mouse spermatozoa; its implications during capacitation. *Developmental Biology* 333(1): 57–66.
- Bernećić NC, Gadella BM, Leahy TM, Graaf SP. 2019. Novel methods to detect capacitation-related changes in spermatozoa. *Theriogenology* 1 (137): 56–66. DOI:10.1016/j.theriogenology.2019.05.038.
- Cancel AM, Lobdell D, Mendola P, Perreault SD. 2006. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using Computer-assisted sperm analysis. *Human Reproduction* 15(6): 1322–1328. DOI: 10.1186/s12958-016-0177-6.
- Chatiza FP, Bartels P, Nedambale TL, Wagenaar GM. 2012. Computer assisted sperm analysis of motility patterns of post thawed epididymal spermatozoa of springbok (*antidorcas arsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*), and blesbok (*damaliscus dorcus phillipsi*) incubated under conditions supporting domestic cattle in vitro fertilization. *Theriogenology* 78(2): 402–414. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.020.
- Coy P, Romar R. 2002. In vitro production of pig embryos: a point of view. *Reprod Fertile Dev* 14(5): 275–286.
- Dirjen Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2019. Statistik peternakan dan kesehatan hewan. Jakarta (ID): Kementrian Pertanian.
- Dow MPD, Bavister. 1989. Direct contact is required between serum albumin and hamster spermatozoa for capacitation in vitro. *Gamete Research* 23(2): 351–360. DOI: 10.1002/mrd.1120230204
- Dzulfiqor Y. 2018. Transformasi inti spermatozoa domba di dalam sitoplasma oosit setelah fertilisasi in vitro. [Thesis]. Institut Pertanian Bogor, Bogor, Indonesia.
- Febretrisiana A, Setiadi MA, Karja NWK. 2015. Tingkat fertilisasi oosit domba dari ovarium yang disimpan pada suhu dan waktu yang berbeda secara in vitro. *JKH Kedokt Hewan* 9(2):109–113.
- Gwatkin RBL. 1977. Fertilization in the cell surface in animal embryogenesis and development. North-Holland, Amsterdam.
- Hafez ESE. 1993. *Reproduction in Farm Animal*. 6th edition. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Herdis, Rizal M, Boediono A, Arifiantini R, Saili T, Aku AS, Yulnawati. (2005). Optimasi kualitas semen beku domba garut melalui penambahan trehalosa ke dalam pengencer kuning telur. *J Pengembangan Peternakan Tropis* 30: 229–236.
- Heriyadi D, Sarwesti A, Nurachma S. 2012. Sifat-sifat kuantitatif sumber daya genetik domba garut jantan tipe tangkas di Jawa Barat. *Bionatura* 14(2): 101–106.
- Ichwandi I. 2004. Performans motilitas, tudung akrosom utuh dan velositas spermatozoa tanpa dan dengan metode ‘swim up’ pasca thawing pada semen beku sapi potong. [Disertasi]. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia.
- Kaiin EM, Gunawan M. 2017. Kualitas sperma sapi basil sexing setelah kapasitas secara in vitro. *Prosiding. DES2017. Bogor (ID)*. *Masy Biodiv Indon* 3(3): 466–470.
- Karja NWK, Fahrudin M, Setiadi MA. 2013. In vitro fertility of post-thawed ram spermatozoa after storage at 5°C before crypreservation. *Media Peternakan* 36(1): 26–30.
- Kovács A, Foote RH. 1992. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech Histochem* 67: 119–124.
- Křížková J, Čoudková V, Maršálek M. 2017. Computer-assisted sperm analysis of head morphometry and kinematic parameters in warmblood stallions spermatozoa. *J Equine* 57(10): 8-17. DOI:10.15414/jmbfs.2018.7.5.472-474.
- Kusindarta DL. 2009. Pengaruh lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan ongole secara in vitro. *J Kedokt Hewan* 3(1): 2–9.
- Latif A, Ijaz A Aleem M, Mahmud A. 2005. Effect of osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm. *Pakistan Vet J* 25(4):179–182.
- Massanyi P, Chrenek P, Lukac N, Makarevich AV, Ostro A, Zivcak J, Bulla J. 2008. Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA System. *J Anim Sci* 41(2): 60-66.
- Morrell JM. 2019. Effect of colloid centrifugation on boar sperm quality during storage and function in in vitro fertilization. *Theriogenology* 1(137): 122-126. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.046.
- Muttaqin Z, Karja, NWK, Setiadi MA. 2015. Kemampuan maturasi dan fertilisasi oosit sapi yang diseleksi menggunakan teknik pewarnaan brilliant cresyl blue. *J Veteriner* 16(2): 242–248.
- Nofa Y, Karja NWK, Arifiantini RI. 2017. Status akrosom dan kualitas post-thawed spermatozoa pada beberapa rumpun sapi dari dua balai inseminasi buatan. *Acta Vet Indones* 5(2): 81–88. DOI: <https://doi.org/10.29244/avi.5.2.81-88>
- Pamungkas FA, Setiadi MA, Karja NWK. 2012. Characteristics an in vitro fertilization ability of ram spermatozoa: comparison epididymal and ejaculated spermatozoa. *Media Peternakan* 35(1): 38–44.

- Ratnawati DN, Isnaini, Susilawati T. 2017. Pemanfaatan casa dalam observasi motilitas spermatozoa semen cair sapi madura dalam pengencer yang berbeda. *Media Peternakan* 27(1): 80-95.
- Rizal M. 2005. Efek berbagai konsentrasi β -karoten terhadap kualitas semen beku domba garut. *Anim Product* 7(1): 6-13.
- Saeki K, Nagao Y, Hoshil M and M. Nagai. 1994. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology* 43:751-759. DOI: [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00017-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00017-3).
- Setiadi MA, Karja NWK. 2013. Tingkat perkembangan awal embrio sapi in vitro menggunakan media tunggal berbahan dasar tissue culture medium (TCM) 199. *J Kedokt Hewan* 7(2): 150-154.
- Simonik O, Sichtar J, Krejcarikova, Rajmon R, Stadnik L, Beran J, Dolezalova M, Biniova Z. 2015 Computer assisted sperm analysis-the relationship to bull field fertility, possible errors and their impact on outputs: A review. *Indian Journal of Animal Sciences* 85(1): 3-11.
- Siudzińska A, Lukaszewicz ET. 2008. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *J Appl Poul Res* 10(17): 101-108. DOI:10.3382/japr.2007-00048.
- Sugiarti TE, Triwulanningsih P, Situmorang RG, Sianturi, dan Kusumaningrum DA. 2004. Penggunaan katalase dalam produksi semen dingin sapi. *Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner* 215-220.
- Sumarsono T. 1998. Peningkatan kualitas spermatozoa kerbau lumpur dengan penambahan asam askorbat dalam pengencer semen beku. [Tesis] Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor (ID).
- Susilawati T. 2011. *Spermatology*. Malang (ID): UB Pr
- Suzuki K, Eriksson B, Shimizu H, Nagai T, Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *J Androl* 23(1): 13-21. DOI: 10.1046/j.1365-2605.2000.t0-1-00198.x.
- Toelihere MR. 1985. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Bandung (ID): Penerbit Angkasa
- Triana IN. 2006. Pengaruh waktu inseminasi terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa pascainseminasi pada kambing. *Berk Penel Hayati* 11: 147-150.
- Triwulanningsih E, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B. 2002. Seleksi dan kapasitas spermatozoa dengan metode percoll gradient vkyuk fertilisasi oosit dan produksi embrio in vitro pada sapi. *Berita Biologi* 6(3): 423-430.
- Utomo, S dan Sumaryati. 2000. Pengaruh suhu penyimpanan 5°C terhadap sperma kambing dan domba dengan pengencer susu skim. *Buletin Pertanian dan Peternakan* 8(2): 70-79.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Viquez L, Barquero V, Soler C, Rolda ERS, Valverde A. 2020. Kinematic sub-populations in bull spermatozoa a comparoson of classical and bayesian Approaches. *Biology* 9(138): 2-16. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248270>.
- Wattimena J. 2006. Pengaruh waktu inkubasi terhadap pola kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa domba in vitro. *JITV* 11(4): 295-301.
- Zarchi MK, Maleki B, Ashkezari MD, Zadeh LM, Agha-Rahimi A. 2020. The effects of in vitro incubation of asthenoteratozoospermic semen after density gradient centrifugation at room temperature and 37°C on sperm parameters, chromatin quality and DNA fragmentation in a short time period. *J Reprod Infertil*. 21(4): 275-282. DOI: <http://dx.doi.org/10.18502/jri.v21i4.4332>.