

Karakteristik dan Jenis Pengencer Semen Sapi Bali: Suatu Review

Bali Cattle Semen Characteristics and Diluent Types: A Review

Angelina Novita Tethool^{1,3)}, Gatot Ciptadi²⁾, Sri Wahjuningsih²⁾, Trinil Susilawati^{2)*}

¹⁾Program Ilmu Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang-Indonesia.

²⁾Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang-Indonesia.

³⁾Jurusan Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Papua, Manokwari-Indonesia.

Article history

Received: Apr 15, 2021;

Accepted: Mei 08, 2022

* Corresponding author:

E-mail:

tsusilawati@ub.ac.id

DOI:

[10.46549/jipvet.v12i1.214](https://doi.org/10.46549/jipvet.v12i1.214)



Abstract

Bali cattle are Indonesian native cattle that are preferred because they have adaptability and reproductive efficiency capabilities. The productivity of this cow can be increased using artificial insemination. The success of IB implementation is determined by the quality of the semen used. This article aims to provide an overview of the quality of fresh semen, after dilution and the types of diluents that have generally been used to maintain Bali cattle spermatozoa. The quality of fresh semen provides an overview of the condition of the semen after storage. Types of diluents that have been used are chemical diluents such as tris aminomethane, CEP, skim milk, andromed and natural diluents such as coconut water, carrot juice, guava filtrate, honey and tomato juice. Bali cattle semen stored in each diluent gives a different quality response depending on the diluent used. This diluent has a different response to semen qualities in cold and frozen storage.

Keywords: Quality of semen; Diluent; Bali cattle; Spermatozoa

Abstrak

Sapi Bali merupakan sapi asli Indonesia yang disukai karena memiliki kemampuan adaptasi dan kemampuan efisiensi reproduksi. Produktivitas sapi ini dapat ditingkatkan menggunakan inseminasi buatan. Keberhasilan pelaksanaan IB ditentukan oleh kualitas semen yang digunakan. Artikel ini bertujuan untuk memberikan gambaran tentang kualitas semen segar, setelah pengenceran dan jenis pengencer yang umumnya telah digunakan untuk mempertahankan spermatozoa sapi Bali. Kualitas semen segar memberikan gambaran kondisi semen setelah penampungan. Jenis pengencer yang telah digunakan adalah pengencer dari bahan kimia seperti tris aminomethane, CEP, susu skim, andromed dan pengencer alternatif seperti air kelapa, sari wortel, filtrat jambu biji, madu dan sari buah tomat. Semen sapi Bali yang disimpan pada masing-masing pengencer memberikan respon kualitas yang berbeda-beda tergantung bahan pengencer yang digunakan. Secara umum pengencer yang digunakan mampu mempertahankan kualitas semen sapi Bali.

Kata kunci: Kualitas semen; Pengencer; Sapi Bali; Spermatozoa

PENDAHULUAN

Sapi Bali merupakan salah satu sapi asli Indonesia yang penyebarannya saat ini cukup luas meliputi daerah Bali, NTT, NTB, Sulawesi Selatan, Lampung, Bengkulu, Kalimantan Tengah (Purwantara *et al.*, 2012; Martojo, 2012) dan Papua (Samberi *et al.*, 2010; Sutarno

dan Setyawan, 2016). Penyebaran sapi Bali tidak hanya terbatas di Indonesia, namun menyebar hingga ke beberapa negara seperti Malaysia, Philipina dan Australia (Sarsaifi *et al.*, 2013). Penyebab sapi Bali disukai dan dipelihara secara luas adalah kemampuannya untuk beradaptasi terhadap kondisi lingkungan, jenis makanan, perubahan iklim yang sangat

ekstrim dan kemampuan efisiensi reproduksi yang sangat baik (Zulkharnaim *et al.*, 2010). Sapi Bali jantan memiliki bobot karkas sebanyak 113.49 kg dengan persentase karkas 54.76% (Suryanto *et al.*, 2014). Keunggulan lain yang dimiliki adalah nilai *service per conception* 1.6-2 (Haryanto *et al.*, 2015; Deskayanti *et al.*, 2020) dengan tingkat konsepsi (CR) adalah 65-86.67% (Mardiansyah *et al.*, 2016; Deskayanti *et al.*, 2020). Peningkatan produktivitas sapi Bali dapat dilakukan menggunakan aplikasi teknologi reproduksi seperti inseminasi buatan (IB).

Inseminasi buatan merupakan teknologi reproduksi pertama yang telah memberikan kontribusi terhadap perbaikan genetik pada sapi. Kemampuan produksi dan potensi genetik sapi jantan dapat dinilai dari kualitas semen yang dihasilkan, sehingga harus disertai dengan teknis produksi semen yang baik karena menjadi salah satu penentu keberhasilan pelaksanaan IB. Pelaksanaan IB dilapangan sangat bergantung pada beberapa faktor, salah satunya adalah kondisi semen yang digunakan, baik semen cair maupun semen beku. Kriteria yang dibutuhkan untuk menunjang produksi semen cair dan semen beku adalah semen harus berkualitas baik dengan daya hidup tinggi dan memerlukan proses pengenceran semen yang efektif, efisien serta mudah diaplikasikan. Kualitas semen setelah penyimpanan dipengaruhi oleh kualitas semen segar sebelum diencerkan, sehingga ejakulasi semen dari seekor pejantan harus memenuhi standar bahwa semen segar memiliki motilitas minimum 70% sesuai SNI 4869-1:2017 tentang semen beku sapi. Nilai motilitas dapat dijadikan sebagai faktor penentu semen yang dihasilkan, agar dapat diolah lebih lanjut untuk penyimpanan dingin maupun beku.

Jenis pengencer yang digunakan dapat memberikan hasil penilaian kualitas spermatozoa yang bervariasi tergantung dari komposisi pengencer. Pengencer yang digunakan adalah pengencer yang dapat mempertahankan spermatozoa selama penyimpanan dan mampu memberikan hasil konsepsi yang tinggi di lapangan (Kulaksiz *et al.*, 2010). Proses pengenceran semen dipengaruhi oleh volume semen, konsentrasi semen, persentase spermatozoa hidup dan bergerak progresif serta dosis semen untuk

diinseminasikan (Ax *et al.*, 2000). Semen yang telah diencerkan, umumnya dikemas dalam straw dan dibekukan. Proses pembekuan akan menurunkan kualitas semen hingga 50% dari kondisi semen segar dan semen yang bertahan memiliki fertilitas yang rendah. Penggunaan pengencer yang tepat turut berperan untuk menentukan kualitas semen beku yang dihasilkan (Ariantie *et al.*, 2013), karena pengencer dapat membantu memperpanjang hidup spermatozoa. Spermatozoa yang mampu mempertahankan hidupnya selama proses pengenceran hingga pembekuan, mengindikasikan bahwa spermatozoa tersebut masih memiliki kemampuan yang bagus untuk fertilisasi. Kualitas spermatozoa yang baik dapat dijadikan sebagai indikator untuk keberhasilan fertilisasi saat IB, baik kualitas semen segar dan kualitas *post thawing* (Susilawati, 2011). Tulisan ini bertujuan untuk mengkaji tentang karakteristik semen dan jenis pengencer yang telah digunakan sebagai upaya untuk mempertahankan kualitas semen sapi Bali.

KUALITAS SEMEN

Evaluasi semen adalah salah satu parameter untuk memprediksi kemampuan seekor pejantan dalam melakukan fertilisasi. Metode yang digunakan untuk evaluasi semen sangat banyak, namun hanya beberapa saja yang digunakan untuk menentukan kualitas semen secara praktis (Moradpour, 2019). Parameter yang digunakan untuk menentukan kualitas semen adalah parameter makroskopik dan mikroskopik. Parameter makroskopik merupakan parameter yang terdiri dari pengamatan volume, warna konsistensi dan pH, sedangkan parameter makroskopik merupakan parameter yang diamati dengan bantuan mikroskop seperti konsentrasi, motilitas, abnormalitas, viabilitas (Rahayu, 2014; Cenariu *et al.*, 2018; Moradpour, 2019). Penilaian kualitas semen sapi Bali secara makroskopik dan mikroskopik pada beberapa penelitian yang telah dilakukan memberikan informasi bahwa terdapat hasil yang berbeda-beda, tergantung pada karakteristik individu yang digunakan (Tabel 1).

VOLUME SEMEN

Volume semen merupakan banyaknya semen yang dihasilkan pada satu kali ejakulasi. Jumlahnya sangat bervariasi dan dipengaruhi oleh umur sapi, bobot badan, status kesehatan, status reproduksi, kualitas pakan yang diberikan, lingkaran skrotum dan frekuensi penampungan. Teknik dan metode penampungan serta persiapan alat penampungan turut serta mempengaruhi volume semen yang dihasilkan. Hasil penelitian Setiawan *et al.*, (2020) menyatakan bahwa variasi umur 4 hingga 6 tahun mengakibatkan peningkatan volume semen sapi Bali yang ditampung. Peningkatan volume disebabkan karena pertumbuhan dan perkembangan organ reproduksi seperti pertambahan lingkaran skrotum, panjang, lebar dan berat testis (Perumal, 2014). Pertambahan umur menyebabkan peningkatan konsentrasi testosteron sehingga kapasitas produksi spermatozoa meningkat (Rajak *et al.*, 2014). Perbedaan bobot badan dan lingkaran skrotum yang dimiliki oleh setiap individu sapi Bali turut mempengaruhi volume semen setiap ejakulasi. Hasil penelitian Fazrien *et al.*, (2020) rerata volume semen yang dihasilkan sapi Bali adalah 5.5-6.9 ml dan 4.54-6.05 ml (Aisah *et al.*, 2017). Perbedaan ukuran lingkaran skrotum juga dapat memberikan pengaruh terhadap volume semen yang dihasilkan oleh seekor pejantan (Ahirwar *et al.*, 2018).

WARNA SEMEN

Warna semen dapat dijadikan sebagai indikator untuk menduga konsentrasi spermatozoa yang berada di dalam semen

secara cepat. Warna pada semen diamati secara visual setelah penampungan, semen yang baik adalah semen yang berwarna putih susu (Aisah *et al.*, 2017) dan krem (Sunarti *et al.*, 2016). Semen yang berwarna bening dapat dijadikan indikator bahwa semen tersebut tidak mengandung banyak spermatozoa, warna kuning menandakan kontaminasi urin, warna hijau adanya nanah dan warna merah atau coklat menandakan adanya darah atau hemolisis (Moradpour, 2019), sehingga warna semen dapat dijadikan sebagai salah satu kriteria penilaian kualitas semen dari tahap awal sebelum dilakukan penilaian lainnya (Kanchan and Matharoo, 2015).

DERAJAT KEASAMAN

Derajat keasaman (pH) merupakan salah satu parameter kualitas yang diukur dengan cara mengambil sedikit semen menggunakan ose dan diletakkan pada kertas indikator pH, selanjutnya dilihat pH semen menggunakan perubahan warna pada kertas tersebut. pH normal semen adalah 6.4-7.8 (Garner and Hafez, 2000), nilai pH sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen (Sunarti *et al.*, 2016). Penurunan pH selama penyimpanan dapat menyebabkan terjadinya penurunan motilitas spermatozoa. Kondisi ini disebabkan karena meningkatnya asam laktat dari hasil metabolisme sel (Dey *et al.*, 2019). Penurunan pH hingga mencapai 5.5 masih dapat ditolerir oleh spermatozoa, namun jika berada dibawah 5.5 menjadi berbahaya pada kehidupan spermatozoa akibat denaturasi enzim yang permanen (Vishwanath and Shannon, 2000).

Tabel 1. Kualitas Semen Segar Sapi Bali

Lokasi	Umur (Tahun)	Makroskopis				Mikroskopis			Referensi
		Volume (mL)	Warna	Konsistensi	ph	Konsentrasi (x10 ⁶)	Motilitas (%)	Abnormalitas (%)	
BIBD Baturiti Tabanan Bali	< 10	6.44 ± 0.23	Putih susu-krem	Sedang	6.4 ± 1.37	7404.94 ± 719.39	-	-	(Nabilla <i>et al.</i> , 2018)
Laboratorium Bioteknologi Hewan Universitas Andalas	3-4	7.94 ± 0.61	Krem	Sedang	7	2.400 ± 40.00	79.37 ± 3.02	13.03 ± 0.50	(Farhana <i>et al.</i> , 2018)
BIB Tenayan Raya Riau	7	5	Krem	Kental	6.5	1883	80	-	(Yendraliza <i>et al.</i> , 2019a)
FELDA Farms, Negeri Sembilan Malaysia	3-4	6.09 ± 0.21	-	-	7.01 ± 0.02	738.99 ± 14.73	75.81 ± 1.27	-	(Sarsaifi <i>et al.</i> , 2013)
BBIB Singosari Malang	4-8	4.83 ± 1.40	-	-	6.51 ± 0.12	1020.90 ± 316.80	67.02 ± 0.12	0.99 ± 0.63 (primer) 3.89 ± 1.43 (sekunder)	(Prastowo <i>et al.</i> , 2018)

BIBD Lampung	-	5.5	Krem	Pekat	6	1724	70	-	75	(Savitri <i>et al.</i> , 2014)
-	4-5	9 ± 2.5	Krem	Kental	6.8 ± 1.2	1600 ± 1.5	80 ± 1.5	3 ± 1.5	90 ± 2.7	(Yendraliza <i>et al.</i> , 2020)
Peternakan Desa Morome, Kab. Konawe Selatan Sulawesi Tenggara	3	5.5±0.53	Putih krem	-	7	1185.57 ± 392.09	80	-	94.71±1.38	(Sunarti <i>et al.</i> , 2016)
-	3-4	4.00 ± 0.79	Krem	Sedang - kental	6.58 ± 0.16	994.20 ± 105.02	76.00 ± 4.18	2.19 ± 1.63	81.07 ± 3.23	(Blegur <i>et al.</i> , 2020)
BIBD Penajam Paser Utara Kalimantan Timur	7	5.3	Putih susu	Encer	6.4	749	70	-	-	(Suhardi <i>et al.</i> , 2020)
UPTD-IB Sulawesi	3-6	5.2-6.4	Putih susu	Sedang - kental	6.3 -6.4	1223.3 – 1909.6	-	3.3 – 4.4	-	(Nirwana dan Suparman, 2017)

KONSISTENSI

Konsistensi adalah derajat kekentalan yang erat kaitannya dengan konsentrasi spermatozoa. Penilaian kekentalan dilakukan pada semen segar yang baru ditampung dengan kriteria penilaian encer, sedang dan kental. Derajat kekentalan berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa yang diperoleh dalam sekali ejakulat. Konsistensi, warna dan konsentrasi spermatozoa memiliki hubungan yang sangat erat, artinya jika konsistensi semen yang dihasilkan semakin encer maka konsentrasi spermatozoa akan semakin rendah dengan warna yang semakin pucat (Iswanto *et al.*, 2012).

KONSENTRASI

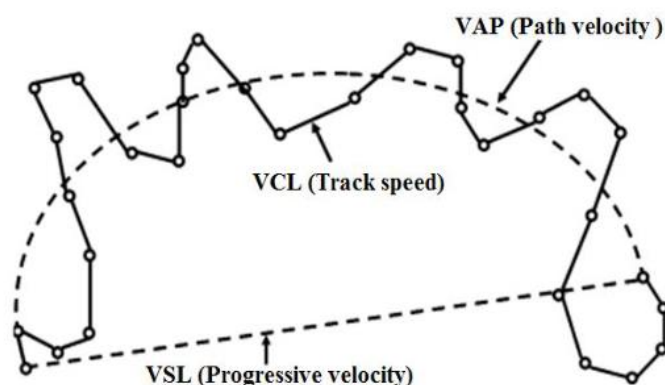
Konsentrasi merupakan banyaknya spermatozoa yang terkandung dalam ejakulat yang dihasilkan. Konsentrasi spermatozoa akan mengikuti perkembangan seksual dan kedewasaan, kualitas pakan yang diberikan, kesehatan alat reproduksi, besar testis, umur dan frekuensi ejakulasi pejantan. Konsentrasi spermatozoa sapi memiliki korelasi positif dengan lingkaran skrotum (Vásquez *et al.*, 2003), yang berarti bahwa dengan bertambahnya ukuran skrotum memungkinkan dihasilkannya spermatozoa dengan jumlah yang lebih banyak. Umur menjadi salah satu faktor yang turut mempengaruhi konsentrasi spermatozoa. Hasil penelitian Nugraha *et al.*, (2019) menjelaskan bahwa umur pada sapi Bali berdampak terhadap fluktuasi konsentrasi spermatozoa yang dihasilkan selama penampungan.

MOTILITAS

Motilitas semen merupakan gambaran dari spermatozoa yang fungsional, sehingga persentase motilitas spermatozoa memiliki

korelasi yang positif dengan integritas membran plasma dan morfologi spermatozoa yang normal (Moradpour, 2019). Pengamatan motilitas harus dilakukan segera setelah penampungan semen. Saat ini pengujian motilitas spermatozoa dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pengujian secara visual menggunakan mikroskop cahaya (Tabel 1) dan pengujian menggunakan *Computer Assisted Semen Analysis* (CASA). Pengujian motilitas secara visual memiliki subyektifitas yang cukup tinggi sehingga dibutuhkan pengalaman dan ketrampilan penguji dalam menilai gerakan spermatozoa. Penggunaan CASA untuk pengujian motilitas dilakukan untuk mendapatkan hasil yang lebih cepat dan akurat (Gambar 1). Beberapa parameter yang dapat terdeteksi menggunakan CASA antara lain (Susilawati, 2013):

1. *Average path velocity* atau VAP ($\mu\text{m}/\text{detik}$) adalah waktu rata-rata kecepatan dari spermatozoa sepanjang alur jalannya.
2. *Straight line velocity* atau VSL ($\mu\text{m}/\text{detik}$) adalah waktu kecepatan rata-rata spermatozoa pada garis lurus diantara awal gerak sampai akhir gerak saat deteksi.
3. *Curve linear velocity* atau VCL ($\mu\text{m}/\text{detik}$) adalah kecepatan rata-rata dari titik gerak sepanjang alur.
4. *Amplitudo of lateral head movement* atau ALH (μm) adalah jarak dari lateral letak gerakan kepala spermatozoa pada setiap rata-rata alur.
5. *Linearity* atau LIN (%) adalah *linearity* dari alur *curve linear* (hasil dari VSL/VCL).
6. *Straightness* atau STR (%) adalah *linearity* dari rata-rata alur (hasil dari VSL/VAP).
7. *Beat cross frequency* atau BCF adalah rata-rata alur *curve linear* spermatozoa melewati rata-rata alurnya.



Gambar 1. Perbedaan Gerak dan Kecepatan Spermatozoa dengan Sistem CASA (Moradpour, 2019).

Pengujian tahap pertama menggunakan CASA meliputi informasi spermatozoa yang bergerak motil dan motil progresif, tahap kedua penilaian hiperaktif, linear, non linier dan curve linier dan tahap ketiga adalah analisis untuk

data sel secara detail seperti VAP, VSL, VCL, LIN, STR dan BSF (Susilawati, 2013). Penilaian semen segar sapi Bali menggunakan CASA telah dilakukan melalui beberapa penelitian seperti yang tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Parameter Penilaian Semen Sapi Bali Menggunakan CASA

Parameter		Nilai		
		(Sarastina <i>et al.</i> , 2007)	(Haryani <i>et al.</i> , 2016)	(Ratnawati <i>et al.</i> , 2018)
Penilaian tahap pertama	Motilitas	83.47±4.27	-	96.5±1.6
	Motilitas progresif	70.68±8.92	-	83.7±4.8
Penilaian tahap kedua	Hiperaktif	11.52±5.29	-	5.2±2.0
	Linier	53.32±15.45	-	-
	Non linier	6.96±2.67	-	-
	Curve linier	3.48±1.56	-	-
Penilaian tahap ketiga	VAP (µm/sec)	71.19±13.42	52.43±8.24	42.7±3.5
	VSL (µm/sec)	60.39±14.65	35.48±3.81	33.1±4.6
	VCL (µm/sec)	121.04±18.1	92.84±19.4	55.0±2.3
	LIN	0.49±0.06	0.39± 0.06	59.6±6.6
	STR	0.82±0.07	0.68± 0.05	76.8±4.4
	BCF (Hz)	30.24±5.54	19.56± 1.58	10.6±1.3

VIABILITAS

Viabilitas merupakan daya hidup spermatozoa. Spermatozoa yang masih hidup ditandai dengan utuhnya membran plasma, sehingga kepala spermatozoa tidak menyerap warna. Kerusakan membran plasma dapat berpengaruh terhadap fungsi dan metabolisme, sehingga menyebabkan kematian spermatozoa. Pengamatan terhadap viabilitas spermatozoa dapat dijadikan indikator integritas struktur membran spermatozoa (Sukmawati *et al.*, 2015). Viabilitas memiliki korelasi dengan motilitas yang ditentukan oleh kekuatan membran plasma spermatozoa (Azzahra *et al.*,

2016). Semen segar sapi Bali umur 4 dan 7 tahun memiliki viabilitas 72.08± 6.63 % dan 71.82±7.38%, semen penyimpanan dingin adalah 57.81±3.83% dan 57.41±6.32%, semen beku adalah 39.47±9.57% dan 35.16±11.74% (Hapsari *et al.*, 2018).

MORFOLOGI

Evaluasi morfologi dilakukan terhadap bentuk abnormalitas dan jenis kerusakan (cacat) dari morfologi tertentu yang dimiliki oleh spermatozoa. Bentuk abnormalitas pada kepala, ekor dan akrosom dapat diamati dengan pewarnaan tertentu, dimana abnormalitas pada

bagian-bagian spermatozoa dihitung hingga mencapai 100-200 sel spermatozoa dalam slide pewarnaan semen (Moradpour, 2019). Abnormalitas pada semen harus memiliki <10% kelainan primer dan <20% kelainan sekunder dan secara keseluruhan total abnormalitas sebanyak <10-20% (Mee, 2007).

PENGECER SEMEN

Pengencer semen merupakan bahan-bahan yang digunakan untuk mempertahankan dan melindungi spermatozoa selama penyimpanan agar dapat digunakan dalam proses IB. Pengencer yang digunakan harus memiliki syarat-syarat tertentu untuk menjamin proses metabolisme dan respirasi spermatozoa tetap berlangsung dengan baik. Komponen yang harus dimiliki oleh pengencer adalah bersifat isotonik (280-310 mOsm/kg), kemampuan sebagai buffer (untuk mengatur pH), melindungi dari *cold shock*, sebagai sumber energi, mampu mengontrol kontaminasi mikroba, memberikan perlindungan selama pembekuan dan *thawing* serta mempertahankan kesuburan spermatozoa (Raheja *et al.*, 2018).

Bahan-bahan yang umum digunakan sebagai pengencer terdiri atas bahan kimia seperti larutan NaCl, KCl, tris, asam sitrat, laktosa, fruktosa, antibiotik, susu skim dan bahan-bahan pengencer alami seperti air kelapa, sari wortel, sari buah tomat, kuning telur, madu, filtrat jambu biji (Sumadiasa *et al.*, 2015; Astuti, 2018; Malik *et al.*, 2018; Marawali *et al.*, 2019; Yendraliza *et al.*, 2019b). Bahan-bahan alami yang digunakan sebagai pengencer harus memiliki syarat-syarat seperti, kandungannya yang mirip dengan kandungan dalam cairan plasma serta bahan-bahan tersebut mudah diperoleh dan tersedia di seluruh wilayah Indonesia dengan harga yang relatif murah. Penggunaan pengencer alami memiliki keterbatasan, seperti sterilitas yang harus benar-benar dijaga selama proses persiapan karena bahan ini mudah rusak, sehingga dalam aplikasinya komponen penyusun dan sterilitas pengencer harus benar-benar diperhatikan.

PENGECER DARI BAHAN KIMIA

Pengencer dari bahan kimia merupakan pengencer dengan kandungan bahan kimia yang mampu mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Beberapa bahan yang sudah umum digunakan untuk mengencerkan semen adalah tris dan asam sitrat (Bohlooli *et al.*, 2012; Susilawati dan Yekti, 2018) yang peranan utamanya adalah untuk mempertahankan pH (buffer), komponen gula seperti laktosa dan fruktosa berfungsi sebagai sumber energi serta antibiotik yang berfungsi sebagai pengendali pertumbuhan bakteri (Susilawati dan Yekti, 2018).

Penggunaan bahan kimia sebagai pengencer semen harus ditambahkan dengan kuning telur, mengingat bahwa komponen bahan kimia saja tidak cukup untuk melindungi spermatozoa. Kuning telur mengandung asam-asam amino dan berperan menjaga integritas selubung lipoprotein membran spermatozoa (Aboagla and Terada, 2004a). Kandungan lainnya yang dimiliki kuning telur adalah karbohidrat, vitamin dan mineral yang berfungsi untuk mempertahankan kehidupan spermatozoa. Senyawa lipoprotein dan lesitin yang terdapat di dalam kuning telur berperan untuk melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Tarig *et al.*, 2017), glukosa dan vitamin yang dimiliki kuning telur juga mudah larut dalam air, sehingga menguntungkan bagi spermatozoa. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis pengencer yang digunakan pada semen sapi Bali memberikan respon yang berbeda-beda terhadap kondisi spermatozoa setelah digunakan dalam proses pendinginan dan pembekuan (Tabel 4). Pengencer bahan kimia yang umum digunakan adalah pengencer tris aminomethane, *caudal epididymis plasma* (CEP), susu skim dan andromed. Penggunaan masing-masing pengencer memiliki komposisi bahan kimia yang berbeda-beda seperti yang tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Beberapa Jenis Pengencer yang Digunakan Untuk Semen Sapi Bali

Komposisi	Tris aminomethane + 20% EY (Hudiatma <i>et al.</i> , 2020)	CEP-3 + 20% EY (Hudiatma <i>et al.</i> , 2020)	Tris-susu skim EY (Yendraliza <i>et al.</i> , 2020)	Andromed (Susilawati, 2013)
NaCl (g/100ml)	-	0.09 g	-	-
KCl (g/100ml)	-	0.05 g	-	-
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (g/100ml)	-	0.04 g	-	-
MgCl ₂ (H ₂ O) ₂ (g/100ml)	-	0.08 g	-	-
NaHCO ₃ (g/100ml)	-	0.10 g	-	-
NaH ₂ PO ₄ (g/100ml)	-	0.11 g	-	-
KH ₂ PO ₄ (g/100ml)	-	0.27 g	-	-
Fruktosa	0.500 g	0.27 g/100 ml	0.2% (w/v)	✓
Laktosa (g/100ml)	1.500 g	-	-	-
Tris	1.363 g	1.61 g/100 ml	3.0 g	-
Asam sitrat (g/100ml)	0.762 g	0.82 g	-	✓
Penisilin (g/100ml)	0.100 g	0.009 g	-	-
Streptomisin (g/100ml)	0.100 g	0.01	-	✓
Kuning telur	20% dalam g/100 ml	20% dalam g/100 ml	20% dalam 74 ml	-
Putih telur (g/100ml)	-	0.4%	-	-
Glyserol	-	-	7.0 ml	✓
Buffer	-	-	-	✓
Phosfolipid	-	-	-	✓
Lincomycin	-	-	-	✓
Spectinomycine	-	-	-	15 mg
Tylocine	-	-	-	5 mg
Gentamycine	-	-	-	25 mg
Aquabidest	-	-	74 ml	✓
Susu skim	-	-	1.56 g	-

Keterangan: CEP-3 (*Caudal Epididymis Plasma* dengan 0.4% putih telur); EY: Kuning Telur

PENGENCER TRIS AMINOMETHANE

Pengencer tris aminometan merupakan pengencer yang sangat umum digunakan untuk pengenceran semen sapi Bali, baik untuk semen cair dan semen beku. Tris aminomethane merupakan *buffer* yang umum digunakan karena memiliki kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah dalam konsentrasi yang tinggi. Bahan lain yang perlu ditambahkan pada pengencer ini adalah bahan anti *cold shock*. Kuning telur atau kacang kedelai merupakan bahan anti *cold shock* yang umum ditambahkan pada pengencer ini (Aboagla and Terada, 2004b), karena dapat melindungi spermatozoa pada saat perubahan suhu dari suhu ruang (saat pengolahan) ke suhu ekuilibrasi (Arifiantini dan Yusuf, 2006).

PENGENCER CAUDAL EPIDIDYMIS PLASMA (CEP)

Caudal epididymis plasma (CEP-2) adalah pengencer yang memiliki komposisi ion dan osmolaritas sama dengan cairan seminalis di *cauda epididymis* (Susilawati dan Yekti, 2018). Pengencer CEP-2 mengandung sumber energi

berupa fruktosa, mineral (seperti Na, Ca, K), pH, dan osmolaritas yang sama dengan keadaan pada plasma *cauda epididymis* (Verberckmoes *et al.*, 2004; Verberckmoes *et al.*, 2005). Pengencer ini dapat menjaga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa yang belum terkapasitasi tetap tinggi, sedangkan spermatozoa yang belum terkapasitasi dan yang sudah mengalami reaksi akrosom dipertahankan tetap rendah (Purwoistri *et al.*, 2013).

Respon CEP sebagai pengencer dapat berperan secara maksimal jika ditambahkan kuning telur, sama seperti pengencer tris aminomethane pengencer CEP juga membutuhkan tambahan kuning telur. Hal ini disebabkan karena kuning telur mampu melindungi spermatozoa dari perubahan suhu dan berperan sebagai pelindung ekstraseluler spermatozoa. Saat ini mulai dikembangkan CEP-3 yang merupakan pengembangan dari CEP-2, namun tanpa kandungan *bovine serum albumin* (BSA) karena harga BSA yang relative mahal. Pengganti BSA pada pengencer CEP-3 menggunakan putih telur bagian dari *thin*

albumen yang berasal dari telur *layer* (Rosary *et al.*, 2018).

PENGECER SUSU SKIM

Susu hasil olahan (susu skim) merupakan salah satu bahan yang digunakan sebagai pengencer semen karena di dalamnya terkandung berbagai jenis senyawa kimia yang dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menunjang kehidupannya selama proses pengolahan dan penyimpanan. Pengencer ini dapat digunakan untuk menyimpan semen dalam bentuk semen cair-dingin (3-5°C) dan beku (nitrogen cair suhu -196°C). Susu skim mengandung zat nutrisi yang dapat dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi, mengandung zat lipoprotein dan lesitin sehingga bisa digunakan dalam pengencer semen untuk melindungi spermatozoa dari pengaruh *cold shock*. Air susu juga mengandung enzim yang akan hancur pada waktu pemanasan, dimana proses pemanasan air susu lebih dari 80°C akan melepaskan gugusan sulfhydryl (-SH) yang berfungsi

sebagai zat reduktif yang mengatur metabolisme oksidatif spermatozoa (Widjaya, 2011).

PENGECER ANDROMED

Pengencer andromed merupakan salah satu pengencer komersil yang tersedia dalam kemasan siap pakai dan tidak menggunakan kuning telur, namun menggunakan lesitin dan kacang kedelai. Kuning telur tidak digunakan pada pengencer ini disebabkan oleh kemungkinan kuning telur menjadi agen pembawa mikroorganisme patogen yang dapat merusak dan bersifat toksik bagi spermatozoa (El-Sisy *et al.*, 2016). Andromed merupakan salah satu pengencer komersial berbahan dasar tris yang paling populer digunakan untuk pengencer semen beku sapi. Komponen penyusun pengencer ini terdiri dari fosfolipid, tris-(hidroksimetil)-aminomethane, asam sitrat, fruktosa, gliserol, tilosin tartrat, gentamisin sulfat, spektinomisin dan linkomisin (Susilawati, 2013; Yendraliza *et al.*, 2020).

Tabel 4. Kualitas Semen Cair dan Setelah *Thawing* sapi Bali pada Beberapa Jenis Pengencer

Jenis Pengencer	Motilitas (%)		Viabilitas (%)		Abnormalitas (%)		Referensi
	Beku	Cair	Beku	Cair	Beku	Cair	
Trisaminometan-kuning telur	43.59 ± 1.2	-	-	-	10.24 ± 2.3	-	(Yendraliza <i>et al.</i> , 2019a)
	-	56.16 ± 17.10	-	73.85 ± 10.39	-	22.68 ± 8.87	(Suhardi <i>et al.</i> , 2020)
CEP-3	57.0 ± 5.63	-	-	-	-	-	(Hudiatma <i>et al.</i> , 2020)
Skim- kuning telur	40.00 ± 5.00	-	52.67 ± 2.52	-	-	-	(Savitri <i>et al.</i> , 2014)
Andromed	53.33 ± 4.08	-	55.00 ± 6.33	-	-	-	(Syarifuddin, <i>et al.</i> , 2019)
	-	50.00 ± 21.54	-	67.41 ± 15.96	-	23.15 ± 9.95	(Suhardi <i>et al.</i> , 2020)

PENGECER ALTERNATIF

Pengencer yang berasal dari bahan-bahan alami dengan kandungan beberapa senyawa kimia yang dibutuhkan oleh spermatozoa dan tidak bersifat toksik umumnya disebut sebagai pengencer alternatif. Pengencer ini diharapkan mampu mempertahankan dan memperpanjang kehidupan spermatozoa. Penggunaan berbagai jenis bahan-bahan alami memberikan respon yang berbeda-beda sesuai dengan kandungan

yang dimiliki oleh bahan-bahan tersebut terhadap masa simpan spermatozoa. Kelemahan penggunaan pengencer dari bahan alami adalah sterilitas penggunaan bahan-bahan selama proses penyiapan harus diperhatikan, karena proses penyiapan yang kurang tepat dapat menghambat pergerakan spermatozoa. Pemanfaatan bahan pengencer alami untuk keperluan IB disarankan dalam bentuk cair ataupun cair-dingin (semen cair yang disimpan pada suhu 3-5°C).

Tabel 5. Kualitas Semen Sapi Bali Menggunakan Beberapa Pengencer Bahan Alternatif

Bahan alami	Parameter				Sumber
	Motilitas (%)	Viabilitas (%)	Abnormalitas (%)	Membran Plasma Utuh (%)	
Sari buah tomat 20%	50.00	76.44	15	-	(Astuti, 2018)
Sari wortel 15% dalam pengencer andromed	65.00±15.95	73.00±4.00	7.50±1.32	68.00±10.54	(Yendraliza, <i>et al.</i> , 2019b)
Penyimpanan hari ke-8					
Filtrat jambu biji 14 % dalam pengencer CEP-2	42.4 ±4.4	47.6±3.4	6.1±1.0	-	(Sumadiasa <i>et al.</i> , 2015)
Air kelapa + <i>dimethyl sulfoxide</i> 3% diamati setelah pengenceran	79.00±5.48	82.83±5.65	-	-	(Hine <i>et al.</i> , 2019)
Madu 0.3% dalam pengencer	53.06±46.08	64.56±31.08	34.67±27.91	-	(Malik <i>et al.</i> , 2018)

Bahan-bahan alami telah digunakan sebagai pengencer semen sapi Bali, seperti sari buah tomat, air kelapa, filtrat jambu biji, sari wortel dan madu (Sumadiasa *et al.*, 2015; Astuti, 2018; Malik *et al.*, 2018; Hine *et al.*, 2019; Marawali *et al.*, 2019; Yendraliza, *et al.*, 2019b). Penggunaan sari buah tomat 20% yang ditambahkan madu dan kuning telur memberikan hasil terbaik pada motilitas, viabilitas dan abnormalitas selama penyimpanan dingin 8 jam (Astuti, 2018). Sari wortel bersama kuning telur mampu mempertahankan kualitas spermatozoa *cauda epididymis* sapi Bali selama penyimpanan pada suhu 3-5°C dengan komposisi terbaik sari wortel adalah 70% dan 30% kuning telur (Parera *et al.*, 2009). Penggunaan pengencer air kelapa yang ditambahkan *dimethyl sulfoxide* 3% memiliki motilitas *post thawing* sebesar 36.00±4.18% (Hine *et al.*, 2019). Secara spesifik penggunaan bahan alami sebagai pengencer dalam mempertahankan kualitas semen dapat dilihat pada Tabel 5.

KESIMPULAN

Kualitas dan jenis pengencer semen sapi Bali menjadi informasi yang sangat penting untuk meningkatkan produksi semen cair dan beku. Pengenceran semen dilakukan

berdasarkan kualitas semen yang dihasilkan saat penampungan. Kualitas semen diketahui melalui pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis, seperti: volume, warna, konsistensi, derajat keasaman (pH), konsentrasi, motilitas, viabilitas dan morfologi. Pengencer bahan kimia (tris aminomethane, CEP, susu skim, andromed) dan pengencer alternatif (air kelapa, sari buah tomat, sari wortel, filtrat jambu biji, madu) saat ini telah dikembangkan dan dapat menjadi pilihan untuk digunakan, karena mampu mempertahankan semen yang dihasilkan. Pengencer ini dapat digunakan untuk menyimpan semen melalui penyimpanan dingin ataupun beku, namun masing-masing pengencer memberikan respon yang berbeda-beda terhadap kualitas semen sapi Bali.

DAFTAR PUSTAKA

- Aboagla, EME, and Terada T. 2004a. Effects of Egg Yolk during the Freezing Step of Cryopreservation on the Viability of Goat Spermatozoa. *Theriogenology*. 62(2):1160-117.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.013>
- Aboagla, EME, and Terada T. 2004b. Effects of the Supplementation of Trehalose Extender Containing Egg Yolk with Sodium Dodecyl

- Sulfate on the Freezability of Goat Spermatozoa. *Theriogenology*. 62(5):809–818.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.003>
- Ahirwar M, Kataktalware M, Prasad K, Pal R, Barman D, Thul M, and Rawat N. 2018. Effect of Non-Genetic Factors on Semen Quality in Bulls: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6(4):38-45.
- Aisah S, Isnaini N, dan Wahyuningsih S. 2017. Kualitas Semen Segar dan Recovery Rate Sapi Bali pada Musim yang Berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 27(1):63-79.
- Ariantje OS, Yusuf TL, Sajuthi D, and Arifiantini, RI. 2013. Effect of Glycerol and Dimethylformamide (DMF) Cryoprotectants on Buck Etawah Crossbreed Frozen Semen Using Modified Tris Diluents. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 18(4):239-250.
<https://doi.org/10.14334/jitv.v18i4.327>
- Arifiantini RI, dan Yusuf TL. 2006. Keberhasilan Penggunaan Tiga Pengencer dalam Dua Jenis Kemasan pada Proses Pembekuan Semen Sapi Frisien Holstein. *Majalah Ilmiah Peternakan*. 9(3):1–11. <https://doi.org/10.24843/MIP>
- Astuti ME. 2018. Pengaruh Penambahan Sari Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*) Sebagai Pengencer Alami Terhadap Kualitas Penyimpanan Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*). *Bionature*. 18(2):129-139.
<https://doi.org/10.35580/bionature.v18i2.6144>
- Ax RL, Dally M, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, and Belin ME. 2000. Semen Evaluation, in *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott William & Wilkins: Baltimore, Maryland, USA. 365-375.
- Azzahra FY, Setiatin ET, dan Samsudewa D. 2016. Evaluasi Motilitas dan Persentase Hidup Semen Segar Sapi PO Kebumen Pejantan Muda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*. 11(2):99–107.
- Blegur J, Nalley WM, dan Hine TM. 2020. Pengaruh Penambahan Virgin Coconut Oil dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Selama Preservasi. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 7(2):130–138.
- Bohlooli S, Cedden F, PishJang J, Razzaghzadeh S, and Bozoğlu Ş. 2012. The Effect of Different Extenders on Post-thaw Sperm Viability, Motility and Membrane Integrity in Cryopreserved Semen of ZandiRam. *Journal of Basic Applied Scientific Research*. 2(2):1120–1123.
- Cenariu M, Pall E, Borzan M, Bogdan L, and Groza I. 2018. Advanced Techniques of Bovine Semen Analysis. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*. 75(1):58-65.
<https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:004317>
- Deskayanti A, Sardjito T, Sunarso A, Srianoto P, Suprayogi TW, and Hermadi HA. 2020. Conception Rate dan Service Per Conception Pada Sapi Bali Hasil Inseminasi Buatan di Kabupaten Sumbawa Barat Tahun 2017. *Ovozoa : Journal of Animal Reproduction*. 8(2):159-163.
<https://doi.org/10.20473/ovz.v8i2.2019>.
- Dey S, Brothag C, and Vijayaraghavan S. 2019. Signaling Enzymes Required for Sperm Maturation and Fertilization in Mammals. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 7(341):1–15.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00341>
- El-Sisy GA, El-Nattat WS, El-Sheshtawy RI, and Abo El-Maaty AM. 2016. Substitution of Egg Yolk with Different Concentrations of Soybean Lecithin in Tris-Based Extender During Bulls' Semen Preservability. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 5(6):514–518.
<https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.10.011>
- Farhana A, Udin Z, Jaswandi J, and Aji RN. 2018. Effect of Extender and Cooling Rate on the Quality of Frozen Thawed Semen of Bali Bull (*Bos sondaicus*). *Buletin Peternakan*. 42(4):273-277.
<https://doi.org/10.21059/buletinpeternak.v42i4.35173>
- Fazrien WA, Herwijanti E, dan Isnaini N. 2020. Pengaruh Variasi Individu terhadap Kualitas Semen Segar dan Beku Pejantan Unggul Sapi Bali. *Sains Peternakan*. 18(1):60-65.
<https://doi.org/10.20961/sainspet.v18i1.37986>
- Garner DL, and Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma, in *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 96- 109.
- Hapsari RD, Khalifah Y, Widyas N, Pramono A, dan Prastowo S. 2018. Age Effect on Post Freezing Sperm Viability of Bali Cattle (*Bos javanicus*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 142:1-4.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/142/1/012007>
- Haryani R, Toleng AL, Sonjaya H, dan Yusuf M. 2016. Characteristic of Bali Bulls Sperms Assessed using Computerized Assisted Semen Analysis (CASA). *International Journal of*

- Sciences: Basic and Applied Research. 28(2):161-168.
- Haryanto D, Hartono M, dan Surharyati S. 2015. Beberapa Faktor yang Mempengaruhi Service Per Conception Pada Sapi Bali di Kabupaten Pringsewu. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 3(3):145-150.
- Hine TM, Uly K, Nalley WM, dan Armadiano H. 2019. Kualitas Sperma Beku Sapi Bali dalam Pengencer Air Kelapa Modifikasi dengan Berbagai Aras Dimethyl Sulfoxide. *Jurnal Veteriner*. 20(1):93-100. [tps://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.1.93](https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.1.93)
- Hudiatma MD, Prasetyo D, Haryani E, Pujianto, J, Kuswati, Yekti, APA, and Susilawati, T. 2020. The Success Rate of Artificial Insemination Using Liquid Semen with Different Diluents in Bali Cattle. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 4(100):45-60. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2020-04.07>
- Iswanto N, Suyadi, dan Rahmawati A. 2012. Pengaruh α -tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethane-Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer Yang Disimpan Pada Suhu 5°C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 22(3):1-8.
- Kanchan, and Matharoo JS. 2015. Effect of Semen Colour on Seminal Characteristics in Cattle Bulls. *Indian Journal of Animal Research*. 49(1):1-46. <https://doi.org/10.5958/0976-0555.2015.00031.X>
- Kulaksiz R, Çebi Ç, Akçay E, and Daşkin A. 2010. The Protective Effect of Egg Yolk from Different Avian Species during the Cryopreservation of Karayaka Ram Semen. *Small Ruminant Research*. 88(1):12-15. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014>
- Malik A, Fauzi R, Zakir MI, dan Sakiman S. 2018. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 5(2):98-104. <https://doi.org/10.29244/avi.5.2.98-104>
- Marawali Al, Abdullah MS, dan Jalaludin J. 2019. Efektivitas Suplementasi Filtrat Jambu Biji dalam Pengencer Air Kelapa-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*. 20(1):20-29. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.1.20>
- Mardiansyah Yuliani E, dan Prasetyo S. 2016. Respon Tingkah Laku Birahi, Service Per Conception, Non Return Rate, Conception Rate pada Sapi Bali Dara dan Induk yang Disinkronisasi Birahi dengan Hormon Progesteron. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Indonesia*. 2(1):134-143.
- Martojo H. 2012. Indigenous Bali Cattle is Most Suitable for Sustainable Small Farming in Indonesia. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(suppl.1):10-14. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01958.x>
- Mee JF. 2007. The Role of the Veterinarian in Bovine Fertility Management on Modern Dairy Farms. *Theriogenology*. 68S:S257-S265. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.030>
- Moradpour F. 2019. A Review on Animals Semen Characteristics: Fertility, Reproduction and Development. *Asian Journal of Advances in Agricultural Research*. 10(2):1-9. <https://doi.org/10.9734/ajaar/2019/v10i230024>
- Nabilla A, Arifiantini RI, dan Purwantara B. 2018. Kualitas Semen Segar Sapi Bali Umur Produktif dan Non-produktif serta Penentuan Konsentrasi Krioprotektan dalam Pengencer Tris Kuning Telur. *Jurnal Veteriner*. 19(2):242. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2018.19.2.242>
- Nirwana N, and Suparman S. 2017. The Effect of Male Age on the Quality of Bali Cattle Fresh Semen. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*. 2(2):13-1. <https://doi.org/10.31327/chalaza.v2i2.296>
- Nugraha CD, Herwijanti E, Novianti I, Furqon A, Septian WA, Busono W, and Suyadi. 2019. Correlations Between Age of Bali Bull and Semen Production at National Artificial Insemination Center, Singosari - Indonesia. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 44(3):258-265. <https://doi.org/10.14710/jitaa.44.3.258-265>
- Parera F, Prihatiny Z, Souhoka DF, dan Rizal DM. 2009. Pemanfaatan Sari Wortel Sebagai Pengencer Alternatif Spermatozoa Epididimis Sapi Bali. *Journal of the Indonesia Tropical Animinaml Agriculture*. 34(1):50-56.
- Perumal P. 2014. Scrotal Circumference and Its Relationship with Testicular Growth, Age, and Body Weight in Tho Tho (*Bos indicus*) Bulls. *International Scholarly Research Notices*. Article ID 249537. <https://doi.org/10.1155/2014/249537>
- Prastowo S, Dharmawan P, Nugroho T, Bachtiar A, Lutojo, and Pramono A. 2018. Kualitas Semen Segar Sapi Bali (*Bos javanicus*) pada

- Kelompok Umur yang Berbeda. *Jurnal Ilmu Ternak*. 18(1):1-7. <https://doi.org/10.24198/jit.v18i1.17684>
- Purwantara B, Noor RR, Andersson G, and Rodriguez-Martinez H. 2012. Banteng and Bali Cattle in Indonesia: Status and Forecasts. *Reproduction in Domestic Animals*. 47 suppl 1(s1):2-6. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.4701956.x>
- Purwoistri R, Susilawati T, dan Rahayu S. 2013. Membran Spermatozoa Hasil Seksing Gradien Albumin Berpengencer Andromed dan Cauda Epididymal Plasma Ditambahkan Kuning Telur. *Jurnal Veteriner*. 14(3):371-378.
- Rahayu S. 2014. The Reproductive Performance of Bali Cattle and It's Genetic Variation. *Berkala Penelitian Hayati*. 20(1):28-35. <https://doi.org/10.23869/bphjbr.20.1.20145>
- Raheja N, Choudhary S, Grewal S, Sharma N, and Kumar N. 2018. A Review on Semen Extenders and Additives Used in Cattle and Buffalo Bull Semen Preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 6(3):239-245.
- Rajak SK, Kumaresan A, Gaurav MK, Layek SS, Mohanty TK, Aslam MKM, Tripathi UK, Prasad S, and De S. 2014. Testicular Cell Indices and Peripheral Blood Testosterone Concentrations in Relation to Age and Semen Quality in Crossbred (Holstein Friesian x Tharparkar) Bulls. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 27(11):1554-1561. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14139>
- Ratnawati D, Isnaini N, and Susilawati T. 2018. Character Motility of Liquid Semen on Ongole Crossbreed (PO), Bali and Madura Bulls with Diluent CEP-2at Cold Storage. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences*. 20(1):21-28.
- Rosary AR, Kuswati K, dan Susilawati T. 2018. Kualitas Semen Cair Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Pengencer CEP-3 Kuning Telur pada Media Simpan yang Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 19(2):87-94. <https://doi.org/10.21776/ub.jtapro.2018.019.02.3>
- Samberi K, Ngadiyono YN, dan Sumadi. 2010. Estimasi Dinamika Populasi dan Produktivitas Sapi Bali di Kabupaten Kepulauan Yapen, Propinsi Papua. *Buletin Peternakan*. 34(3):169-177.
- Sarastina, Susilawati T, dan Ciptadi G. 2007. Analisa Beberapa Parameter Motilitas Spermatozoa Pada Berbagai Bangsa Sapi Menggunakan Computer Assisted Semen Analysis (CASA). *Jurnal Ternak Tropika*. 6(2):1-12.
- Sarsaifi K, Rosnina Y, Ariff M, Wahid H, Hani H, Yimer N, Vejayan J, Win NS, and Abas M. 2013. Effect of Semen Collection Methods on the Quality of Pre- and Post-Thawed Bali Cattle (*Bos javanicus*) Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 48(6):1006-1012. <https://doi.org/10.1111/rda.12206>
- Savitri F, Suharyati S, and Siswanto S. 2014. Kualitas Semen Beku Sapi Bali dengan Penambahan Berbagai Dosis Vitamin C pada Bahan Pengencer Skim Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2(3):30-36. <https://doi.org/10.23960/jipt.v2i3.499>
- Setiawan B, Nurul I, and Setyawan IA. 2020. Influence of Bull Age on Fresh Semen Traits of Bali Cattle. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*. 2(98):27-30. <https://doi.org/10.18551/rjoas.2020-02.04>
- Suhardi R, Megawati N, Ardhani F, Sumppunn P, and Wuthisuthimethavee S. 2020. Motility, Viability, and Abnormality of the Spermatozoa of Bali Bull with Andromed® and Egg Yolk-Tris Diluents Stored at 4°C. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 10(2):249-256.
- Sukmawati E, Arifiantini RI, and Purwantara B. 2015. Freezing Capacity of Sperm on Various Type of Superior Bulls. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 19(3):168-175. <https://doi.org/10.14334/jitv.v19i3.1079>
- Sumadiasa IL, Susilawati T, Ciptadi G, and Isnaini N. 2015. The Potency of Guava Filtrate (*Psidium guajava linn*) for Preservation of Bali Bull Spermatozoa. *IOSR-Journal of Agriculture and Veterinary Science*. 8(5):51-57.
- Sunarti S, Saili T, and Nafiu LO. 2016. Karakteristik Spermatozoa Sapi Bali Setelah Sexing Menggunakan Metode Kolom Albumin dengan Lama Waktu Sexing yang Berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 3(1):65-76. <https://doi.org/10.33772/jitro.v3i1.1071>
- Suryanto E, Bulkaini, Ashari, and Karda IW. 2014. Carcass Quality, Marbling and Cholesterol Content of Male Bali Cattle Fed Fermented Cocoa Shell. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 39(4):249-255. <https://doi.org/10.14710/jitaa.39.4.249-255>
- Susilawati T. 2011. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan dengan Kualitas dan Deposisi Semen Yang Berbeda pada Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Ternak Tropika*. 12(2):15-24.
- Susilawati T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan*

- Pada Ternak* (Cetakan Pertama). Universitas Brawijaya Press. Malang. 29-120.
- Susilawati T, dan Yekti APA. 2018. *Teknologi Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Cair (Liquid Semen)* (Cetakan Pertama). Universitas Brawijaya Press. Malang. 36-116.
- Sutarno, and Setyawan AD. 2016. The Diversity of Local Cattle in Indonesia and the Efforts to Develop Superior Indigenous Cattle Breeds. *Biodiversitas*. 17(1):275-295. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d170139>
- Syarifuddin A, Laksmi DNDI, dan Bebas W. 2012. Efektifitas Penambahan berbagai Konsentrasi Glutathion terhadap Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa sapi Bali *Post Thawing*. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1(2):173-185.
- Tarig AA, Wahid H, Rosnina Y, Yimer N, Goh YM, Baiee FH, Khumran AM, Salman H, and Ebrahimi M. 2017. Effect of Different Concentrations of Egg Yolk and Virgin Coconut Oil in Tris-Based Extenders on Chilled and Frozen-Thawed Bull Semen. *Animal Reproduction Science*. 182:21-27. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.03.024>
- Vásquez L, Vera O, and Arango J. 2003. Testicular Growth and Semen Quality in Peripuberal Brahman Bulls. *Livestock Research for Rural Development*. 15(10):76.
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Pauw I, and De Kruif A. 2004. Storage of Fresh Bovine Semen in a Diluent Based on the Ionic Composition of Cauda Epididymal Plasma. *Reproduction in Domestic Animals*. 39(6):410-416. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00521.x>
- Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, and De Kruif A. 2005. Comparison of Three Diluents for the Storage of Fresh Bovine Semen. *Theriogenology*. 63(3):912-922. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.011>
- Vishwanath R, and Shannon P. 2000. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State. *Animal Reproduction Science*. 62:23-53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6)
- Widjaya N. 2011. Pengaruh Pemberian Susu Skim dengan Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Daya Tahan Hidup Spermatozoa Sapi pada Suhu Penyimpanan 5°C. *Sains Peternakan*. 9(2):72-76. <https://doi.org/10.20961/sainspet.v9i2.4796>
- Yendraliza, Harahap AE, Handoko J, Rodiallah M, and Arman C. 2020. Quality of Bali Bull Cryopreserved Sperm Using Different Extenders And Equilibration Times On Pregnancy Rate Of Bali Cows. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 42(3):652-659.
- Yendraliza, Tania T, Misrianti R, and Zumarni Z. 2019a. Livability and Recovery Rate of Bali Cattle Spermatozoa during Preservation in Tris-Based Egg Yolk Diluent With Different Sucrose Levels. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 13(2):55–60. <https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v13i2.13033>
- Yendraliza, Musyrifin M, Elviridi E, Zumarni Z, dan Rodiallah M. 2019b. 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/10.33772/jitro.v6i2.5936>
- Zulkharnaim, Jakaria, and Noor RR. 2010. Identification of Genetic Diversity of Growth Hormone Receptor (GHR|alu I) Gene in Bali Cattle. *Media Peternakan*. 33(2):81-87. <https://doi.org/10.5398/medpet.2010.33.2.81>