

Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Setelah Preservasi Menggunakan Pengencer Tris Kuning Telur dan Madu Dengan Level Berbeda

(Bali Cow Spermatozoa Quality After Preservation Using Tris Yellow Egg And Honey With Different Levels)

Andi Dzulqarnain¹, Takdir Saili^{1*}, Muh. Rusdin¹

¹Fakultas Peternakan, Universitas Halu Oleo, Kampus Hijau Bumi Tridarma Anduonohu Jl. H. E.A. Mokodompit, Kendari, Sulawesi Tenggara

* Corresponding author: takdir69@uho.ac.id

Abstrak. Madu sebagai tambahan bahan pengencer pada semen sapi Bali berpotensi dapat mempertahankan kualitas spermatozoa. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis kualitas spermatozoa sapi Bali setelah diencerkan mengandung tris kuning telur dan madu dengan level berbeda, sebelum dan sesudah equilibrasi. Materi yang digunakan adalah semen segar sapi bali jantan dan madu.. Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan, sehingga terdapat 16 unit satuan percobaan. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian pengencer tris kuning telur dan madu dengan konsentrasi berbeda yang terdiri atas P0 (Tris kuning telur + Gliserol 6%), P1 (Tris kuning telur + Gliserol 4% + madu lebah hutan 2%), P2 (Tris kuning telur + Gliserol 2% + madu lebah hutan 4%), dan P3 (Tris kuning telur + Madu lebah hutan 6%). Parameter yang dievaluasi adalah persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah pengenceran, persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah equilibrasi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa rata-rata nilai persentase motilitas spermatozoa setelah diencerkan berkisar antara (70,0 – 72,5%), dan viabilitas spermatozoa (79,4 – 86,6%). Sedangkan rata-rata nilai persentase motilitas spermatozoa setelah equilibrasi berkisar antara (12,5 – 70,3%), dan viabilitas spermatozoa (44,1 – 76,4). Kesimpulan hasil penelitian ini adalah penggunaan madu sebagai bahan pengencer spermatozoa sapi bali pengganti gliserol tidak berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa setelah diencerkan, tetapi berpengaruh nyata terhadap viabilitas spermatozoa dengan tren menurun dan penggunaan madu sebagai bahan pengencer spermatozoa sapi bali pengganti gliserol setelah equilibrasi berpengaruh nyata menurunkan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa. Perlakuan terbaik yaitu pada P0 dengan Tris kuning telur + Gliserol 6%. Pemanfaatan madu sebagai tambahan bahan pengencer dalam proses pengenceran semen sapi bali dapat mempertahankan kualitas spermatozoa setelah preservasi.

Kata Kunci: Madu, Tris Kuning Telur dan Spermatozoa Sapi Bali

Abstract. This study aims to analyze the quality of Bali cattle spermatozoa given a diluent containing different levels of tris egg yolk and honey. The research design used a completely randomized design (CRD) with 4 treatments and 4 replications, so that there were 16 experimental units. The treatments used in this research were diluting tris egg yolk and honey with different concentrations consisting of P0 (Tris egg yolk + 6% glycerol), P1 (Tris egg yolk + Glycerol 4% + forest honey 2%), P2 (Tris egg yolk + 2% glycerol + 4% forest bee honey), and P3 (Tris egg yolk + 6% forest bee honey). The parameters evaluated were the percentage of motility and viability of spermatozoa after dilution, percentage of motility and viability of spermatozoa after equilibration. The mean percentage of spermatozoa motility after dilution

ranged from 70.0 - 72.5%, and the viability of spermatozoa 79.4 - 86.6%, while the mean percentage of spermatozoa motility after equilibration ranged from 12.5 - 70.3%, and viability of spermatozoa 44.1 - 76.4. The conclusion of this study is that the use of honey as a substance to dilute spermatozoa in Bali cattle substitutes for glycerol has no effect on sperm motility. oa after being diluted, but significantly affected the viability of spermatozoa with a decreasing trend and the use of honey as a diluent for Bali cattle spermatozoa as a substitute for glycerol after equilibration had a significant effect on reducing the percentage of spermatozoa motility and viability. The best treatment is at P0 with Tris egg yolk + 6% glycerol. Utilization of honey as an additional diluent in Bali cattle semen dilution process can maintain the quality of spermatozoa after preservation.

Keywords: Honey, Egg Yolk Tris and Bali Cattle Spermatozoa

1. Pendahuluan

Teknologi reproduksi yang ditujukan untuk meningkatkan produktivitas ternak ada beberapa macam, antara lain Inseminasi Buatan (IB), Embrio Transfer (ET) dan In Vitro Fertilisasi (IVF). Keberhasilan penerapan teknologi reproduksi tersebut di lapangan sangat bervariasi dan sangat tergantung dari peruntukannya. Pada awalnya, teknologi IB hanya diaplikasikan pada ternak sapi perah karena umumnya ternak sapi perah dipelihara secara intensif sehingga memudahkan untuk pengamatan berahinya. Seiring dengan perkembangan waktu, teknik IB juga sudah diterapkan pada sapi potong termasuk sapi bali. Produktivitas ternak sapi bali sebagai sapi lokal cukup baik karena memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap lingkungan dan dapat menggunakan sumber pakan yang terbatas [1].

Sumber semen yang digunakan pada pelaksanaan IB dapat berupa semen cair maupun semen beku [2]. Kedua jenis semen tersebut terlebih dahulu mengalami proses pengenceran sebelum digunakan atau diproses lebih lanjut. Bahan pengencer semen harus mempunyai sifat dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan. Selain itu, bahan pengencer juga harus dapat menyediakan nutrisi bagi kebutuhan spermatozoa, dapat memungkinkan spermatozoa bergerak secara progresif, tidak bersifat racun, menjadi penyangga, melindungi spermatozoa dari kejutan dingin (*Cold shock*), serta menyediakan energi. Ketersediaan sumber energi yang berasal dari karbohidrat merupakan salah satu syarat untuk pengencer semen yang baik. Karbohidrat dapat menjadi sumber energi bagi spermatozoa selama inkubasi, memelihara tekanan osmotik cairan dan dapat bertindak sebagai krioprotektan [3].

Fruktosa adalah salah satu jenis karbohidrat yang juga banyak terdapat pada madu. Oleh karena itu madu sangat berpotensi sebagai bahan pengencer pada pembekuan semen sapi. [4], substitusi madu asli sebagai pengganti gliserol dalam proses pembekuan dengan pengencer skim kuning telur dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi bali pasca-*thawing*. Penambahan fruktosa dan glukosa dalam pengencer berguna untuk mendukung daya hidup spermatozoa pasca pengenceran. [5], pemberian sekitar 10% madu dapat meningkatkan kualitas spermatozoa manusia pasca-*thawing*.

2. Materi dan Metode Penelitian

2.1 Materi Penelitian

Materi utama yang digunakan pada penelitian ini adalah semen sapi bali yang diperoleh dari sapi bali jantan yang berumur ± 4 tahun dan berat ± 500 kg. Bahan yang digunakan adalah medium Tris kuning telur (*tris aminomethan*, rafinosa, laktosa, asam sitrat, kuning telur, penisilin, *streptomycin*). Selain itu, juga digunakan madu, NaCl fisiologis 0,9%, pewarna eosin dan gliserol. Alat yang

digunakan adalah vagina buatan, tabung reaksi, gelas ukur, rak tabung reaksi, termometer, *pH paper*, *object glass*, *cover glass*, *spektrofotometer* SDM 6, *water bath*, mikroskop, dan lemari pendingin.

2.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri atas 4 perlakuan dan masing-masing perlakuan terdiri atas 4 ulangan. Model matematika dari rancangan yang digunakan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana: Y_{ij} = Respon perlakuan ke-i ($i = 1,2,3,4$), dan ulangan ke-j ($j = 1,2,3,4$)

μ = Rataan umum

α_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = Galat percobaan perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Perlakuan penelitian adalah sebagai berikut;

P0 = Tris kuning telur + Gliserol 6%,

P1 = Tris kuning telur + Gliserol 4% + madu lebah hutan 2%,

P2 = Tris kuning telur + Gliserol 2% + madu lebah hutan 4%, dan

P3 = Tris kuning telur + Madu lebah hutan 6%.

Analisis data yang dikumpulkan dianalisis dengan sidik ragam (*Analysis of variance*). Perlakuan yang berpengaruh nyata ($P < 0,05$), diuji lanjut dengan uji BNT dan DMRT untuk mengetahui beda antar perlakuan menggunakan program IBM Statistics SPSS 24 [6].

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Kualitas Semen Segar

Hasil penelitian yang dilakukan diperoleh data rata-rata kualitas semen segar sapi bali, yang meliputi volume, warna, bau, pH, konsistensi, pergerakan massa, motilitas individu, dan konsentrasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segara sapi bali

Parameter	Nilai
Volume (ml)	6,1±2,2
Warna	Putih susu/krem
Bau	Khas
pH	6,5±0,2
Konsistensi	Sedang/kental
Pergerakan massa	+++
Motilitas Individu (%)	86±7,5
Konsentrasi (juta/ml)	1.057±3,2

Data pada Tabel 3.1 menunjukkan bahwa rata-rata volume semen segar sapi bali yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 6,1±2,2 ml. [7], bahwa rata-rata volume semen sapi bali adalah 6,57±1,63 ml. [8], volume semen sapi berkisar 5 - 8 ml, [9], volume semen sapi bali berkisar antara 5 - 8 ml.

Warna semen segar sapi bali berwarna putih susu, [8], semen sapi normal berwarna putih susu atau krem keputihan dan keruh, derajat kekeruhannya tergantung pada konsentrasi spermatozoa. [9], warna semen sapi yang baik (normal) berwarna putih susu atau krem keputihan dan keruh, ada pula yang kekuningan (10%) karena pengaruh *riboflavin* yang bersifat *autosomal resesif*.

Bau semen segar sapi bali berbau khas sapi bali jantan. [10], bau semen sapi bali memiliki bau amis khas disertai dengan bau dari hewan itu sendiri. Kemudian [7], semen segar sapi bali di Laboratorium UPTD BPPT Prov. Sultra, memiliki bau yang khas.

Derajat keasaman (pH) semen segar sapi bali 6,5 ±0,2. [7], rata-rata nilai pH hasil evaluasi makroskopis semen segar sapi bali di Laboratorium UPTD BPPT Prov. Sultra, sebesar 6,42 ± 0,23.

[9], keasaman semen dapat diketahui menggunakan pH meter atau kertas lakmus. Semen sapi mempunyai pH 6,2 sampai 6,8. [8], setiap bangsa sapi mempunyai nilai pH semen segar yang berbeda-beda. Hal ini menandakan bahwa pH semen yang didapatkan pada sapi dalam keadaan stabil karena berada dalam kisaran 5,9 – 7,3. Oleh karena itu pH semen segar sapi bali dalam penelitian ini dapat dikatakan normal.

Kualitas semen segar sapi bali berada pada konsistensi sedang/kental. Kekentalan atau konsistensi merupakan salah satu sifat semen yang kaitan dengan kepadatan atau konsentrasi spermatozoa di dalamnya. Semakin kental semen semakin tinggi konsentrasi spermatozoanya [8]. Konsistensi atau kekentalan semen dapat diketahui dengan cara menggoyang-goyangkan tabung yang berisi semen secara pelan-pelan, dengan mengetahui warna normal dapat diprediksikan konsentrasi spermatozoa yaitu; 1.000 sampai 2.000 juta/ml (kental/sedang) [9].

Gerak massa spermatozoa segar sapi bali menyerupai awan tebal dan bergerak cepat (+++). [9], penilaian sangat baik (+++) bila diamati dengan pembesaran 10X terjadi gelombang besar, tampak gelap, tebal, aktif, dan cepat berpindah. Keadaan ini diperkirakan mengandung 80 - 100% spermatozoa motil progresif.

Motilitas spermatozoa segar sapi bali dalam penelitian diperoleh nilai rata-rata $86 \pm 7,5\%$. [4], persentase motilitas spermatozoa segar sapi bali $76,63 \pm 3,21\%$. [11], motilitas semen segar sapi berkisar antara 70 - 90%. Hal tersebut menandakan motilitas individu yang didapat masih dalam kisaran normal dan dapat digunakan untuk produksi semen beku, sedangkan motilitas spermatozoa di bawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik karena kebanyakan persentase yang fertil berkisar 50 - 80% yaitu spermatozoa yang motil aktif progresif [8].

Konsentrasi spermatozoa semen segar sapi bali diperoleh dengan menggunakan alat *spektrofotometer* SDM 6, dengan nilai konsentrasi spermatozoa sebanyak $1.057 \times 10^6 \pm 3,2$ juta/ml. [9], konsentrasi semen sapi bali yang normal bersifat kental dengan jumlah spermatozoa 1.000 sampai 2.000 juta/ml yang dapat diukur dengan bantuan alat *spektrofotometer*. [12], konsentrasi spermatozoa dapat dihitung menggunakan alat *spektrofotometer* atau dihitung secara manual dapat dilakukan secara bersamaan dengan penentuan keutuhan membran plasma spermatozoa dengan menggunakan alat *haemocytometer*.

3.2 Persentase Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Setelah Diencerkan

Rata-rata persentase kualitas spermatozoa sapi bali setelah diencerkan dan equilibrasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase kualitas spermatozoa sapi bali setelah diencerkan dan equilibrasi

Parameter	Perlakuan (%)			
	P0	P1	P2	P3
Motilitas Spermatozoa cair	72,5 $\pm$ 2,9	70,5 $\pm$ 2,1	70,3 $\pm$ 3,3	70,0 $\pm$ 3,7
Viabilitas Spermatozoa cair	86,6 $\pm$ 1,9 ^a	84,8 $\pm$ 4,5 ^{ab}	80,1 $\pm$ 3,8 ^{bc}	79,4 $\pm$ 4,1 ^c
Motilitas Spermatozoa equilibrasi	71,3 $\pm$ 3,0 ^a	62,5 $\pm$ 6,0 ^a	43,8 $\pm$ 5,0 ^b	12,5 $\pm$ 5,0 ^c
Viabilitas Spermatozoa equilibrasi	76,4 $\pm$ 6,8 ^a	65,2 $\pm$ 8,1 ^a	46,6 $\pm$ 7,5 ^b	44,1 $\pm$ 7,8 ^b

Keterangan : Huruf superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

3.3 Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Bali Setelah Diencerkan

Hasil analisis ragam pada Tabel 2. menunjukkan bahwa perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah diencerkan. Artinya perlakuan madu dan gliserol sampai pada 6 % memberikan pengaruh yang sama terhadap persentase motilitas setelah diencerkan. Rataan persentase motilitas spermatozoa berkisar antara $70,0 \pm 3,7 - 72,5 \pm 2,9\%$ dengan rata-rata umum $70,8 \pm 3,0\%$. Rataan umum motilitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan [13], rata-rata motilitas setelah pengenceran dengan madu dan kuning telur pada penyimpanan 0 jam diperoleh nilai 50,0%. Namun lebih rendah dibanding [14], rata-rata persentase motilitas spermatozoa epididimis sapi bali yang dipreservasi pada suhu 3 – 5 °C pada hari

pertama diperoleh 75,0%. [15], penambahan madu dalam pengencer kuning telur dapat meningkatkan motilitas.

3.4 Persentase Viabilitas Spermatozoa Setelah Diencerkan

Hasil analisis ragam pada Tabel 2. menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa setelah diencerkan. Artinya perlakuan madu dan gliserol sampai pada 6 % memberikan pengaruh yang berbeda terhadap penurunan persentase viabilitas spermatozoa setelah diencerkan dengan P0 tidak berbeda nyata terhadap P1, namun berbeda nyata terhadap P2 dan P3, P1 tidak berbeda nyata terhadap P2 namun berbeda nyata terhadap P3, dan P2 tidak berbeda nyata terhadap P3.

Hasil penelitian ini tidak berbeda jauh dengan penelitian [16], 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 spermatozoa seiring dengan pengurangan dosis gliserol dan penambahan dosis madu sebagai krioprotektan. Hasil persentase viabilitas pada spermatozoa segar dari $82,19 \pm 1,41\%$ menurun menjadi 60% pada nilai semua perlakuan. Penurunan viabilitas tersebut diduga karena adanya berbagai proses yang terjadi pada spermatozoa antara lain penyimpanan pada suhu rendah.

Madu berfungsi sebagai senyawa krioprotektan ekstraseluler, juga dapat berperan sebagai substrat sumber energi bagi spermatozoa selama proses preservasi, sehingga dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa [17]. Laktosa dan maltosa dalam madu merupakan karbohidrat golongan disakarida yang terdiri atas dua unit monosakarida, yakni satu unit glukosa dan satu unit galaktosa untuk laktosa serta dua unit glukosa untuk maltosa, yang semuanya dapat dimetabolisme oleh spermatozoa untuk menghasilkan energi berupa *Adenosin Tri Phosphate* (ATP) [5].

3.5 Persentase Motilitas Spermatozoa Setelah Equilibrasi

Hasil analisis ragam pada Tabel 2. menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah equilibrasi. Artinya perlakuan madu sebagai pengganti gliserol sampai pada 6 % memberikan pengaruh yang berbeda terhadap penurunan persentase motilitas spermatozoa setelah equilibrasi dengan P0 tidak berbeda nyata terhadap P1, namun berbeda nyata terhadap P2 dan P3, P1 berbeda nyata terhadap P2 dan P3, dan P2 berbeda nyata terhadap P3.

Sebagaimana yang dibuktikan dengan uji lanjut menunjukkan perlakuan penambahan madu dengan level berbeda belum cukup mampu mempertahankan motilitas spermatozoa setelah equilibrasi selama 2 jam. Pada P3 persentase motilitas spermatozoa berbeda nyata dengan P0, dimana persentase motilitas spermatozoa P3 mengalami penurunan. [4], meski tidak berpengaruh pada semua perlakuan namun terdapat tren penurunan motilitas dan viabilitas sperma seiring dengan pengurangan dosis gliserol dan penambahan dosis madu untuk krioprotektan.

Nilai persentase motilitas spermatozoa pada P3 menunjukkan angka motilitas terkecil bila dibandingkan dengan P0, P1, dan P2. Hal ini dikarenakan ketidak mampuan spermatozoa untuk bertahan pada suhu rendah selama penyimpanan dalam melindungi membran spermatozoa (kriopreservasi) sehingga terbentuknya kristal es pada membran plasma spermatozoa. [1], penggunaan madu sebagai kriopreservasi perlu dilakukan uji lanjut untuk dijadikan sebagai krioprotektan, terkait dengan kandungan madu yang kaya akan nutrisi seperti fruktosa, glukosa, serta sukrosa sebagai sumber energi belum mampu melindungi sperma selama proses pembekuan sehingga akan berdampak pada kualitas pasca-*thawing*.

Rataan persentase motilitas spermatozoa berkisar antara $12,5 \pm 5,0 - 71,3 \pm 3,0\%$ dengan rata-rata umum $47,5 \pm 23,7\%$. Rataan umum motilitas spermatozoa setelah equilibrasi sedikit lebih rendah dibanding laporan [14], bahwa rata-rata motilitas setelah pengenceran dengan madu dan kuning telur pada preservasi 2 jam diperoleh nilai 48,33%. Dan juga lebih rendah dibanding dengan hasil penelitian [16], bahwa rata-rata persentase motilitas spermatozoa epididimis sapi bali yang dipreservasi pada suhu 3–5 °C pada hari kedua diperoleh 59,00%.

3.6 Persentase Viabilitas Spermatozoa Setelah Equilibrasi

Hasil analisis ragam pada Tabel 2. menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa setelah equilibrasi. Artinya perlakuan madu sebagai pengganti gliserol sampai pada 6 % memberikan pengaruh yang berbeda terhadap penurunan persentase viabilitas spermatozoa setelah equilibrasi dengan P0 tidak berbeda nyata terhadap P1, namun berbeda nyata terhadap P2 dan P3, P1 berbeda nyata terhadap P2 dan P3, dan P2 tidak berbeda nyata terhadap P3. [18], penambahan dosis gliserol 6% pada perlakuan memberikan pengaruh terhadap motilitas spermatozoa sebesar 43,33%, Namun konsentrasi maksimal penggunaan gliserol dalam proses pembekuan semen adalah 8% karena akan mengakibatkan kerusakan sel [19].

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa seiring dengan penambahan konsentrasi madu sebagai bahan pengencer, diduga madu tidak dapat memodifikasi kristal es yang terbentuk selama penyimpanan pada suhu rendah, sehingga spermatozoa tidak mampu bertahan hidup akibat adanya kerusakan membran spermatozoa [16]. [8], madu tidak lebih baik dari gliserol Sementara gliserol dapat memodifikasi tipe kristal es yang terbentuk sewaktu pembekuan, sehingga kerusakan secara mekanis dapat tercegah.

Rendahnya angka viabilitas spermatozoa akibat penggunaan madu sebagai pengganti gliserol dalam bahan pengencer tris-KT dalam penelitian [20], keberadaan sukrosa dan jenis gula lain, memiliki arti penting di dalam bahan pengencer, yaitu sebagai substrat sumber energi dan krioprotektan ekstraseluler bagi spermatozoa.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian, dapat disimpulkan bahwa: 1) Kualitas spermatozoa sapi bali setelah diencerkan menggunakan Tris kuning telur dan madu dengan level berbeda menunjukkan perbedaan pada viabilitas, tetapi tidak berbeda pada motilitas spermatozoa; 2) Kualitas spermatozoa sapi bali setelah equilibrasi yang diencerkan menggunakan Tris kuning telur dan madu dengan level berbeda menunjukkan perbedaan pada viabilitas dan motilitas spermatozoa; 3) Kualitas spermatozoa sapi bali yang optimal ditemukan pada penggunaan madu sebagai bahan pengencer dengan level 2%.

Daftar Pustaka

- [1] Guntoro, S. 2008. Membudidayakan Sapi Bali. Kanisius. Yogyakarta. (ID)
- [2] Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran. 2011. Instruksi Kerja Balai Inseminasi Buatan Ungaran. Jawa Tengah (ID)
- [3] Mukminat, A., S. Suharyatib, dan Siswanto. 2014. Pengaruh penambahan berbagai sumber karbohidrat pada pengencer skim kuning telur terhadap kualitas semen beku sapi bali. JITRO. 6(1):88-90.
- [4] Malik, A., F. Rian, M.I. Zakir dan Sakiman. 2017. Substitusi madu asli pengganti gliserol dalam pembekuan pada kualitas pasca-thawing spermatozoa sapi bali. Jurnal ACTA Veterinaria. 5(2):98-104.
- [5] Fakhrildin, M.B. and R.A. Alsaadi. 2014. Honey supplementation to semen freezing medium improves human sperm parameters postthawing. Journal of Family Planning and Reproductive Health. 8(1):27-31.
- [6] Mattjik, A.A. dan I.M. Sumertajaya. 2013. Rancangan Percobaan dengan Aplikasi SAS dan Minitab. IPB Bogor: 276
- [7] Lopulalan, F., T. Saili dan L. Baa. 2018. Kualitas dan fertilitas spermatozoa sapi bali hasil *sexing* dengan menggunakan metode *Swim-down*. JITRO. 5(2):2-7.
- [8] Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung. (ID)
- [9] Ismaya. 2014. Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. (ID)
- [10] Maria N.J.S. 2016. Uji viabilitas spermatozoa sapi bali jantan dengan menggunakan larutan natrium clorida (NaCl) yang berbeda level. Jurnal of Animal Science. 1(2):28-29

- [11] 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.
- [12] Saili, T. 2014. Pengantar Teknologi Reproduksi. Tunggal Mandiri. Malang. (ID)
- [13] Mardiana. 2017. Perbandingan pengencer andromed, susu skim dan pengencer alami terhadap kualitas spermatozoa sapi bali (*Bos sondaicus*). *Jurnal Bionature*. 18(1):21-32
- [14] Labetubun, J. dan Isak. 2011. Kualitas spermatozoa kauda epididimis sapi bali dengan penambahan laktosa atau maltosa yang dipreservasi pada suhu 3-5°C. *Jurnal Veteriner*. 12(3):200-207.
- [15] Olayemi, F.O., D.A. Adenigi dan M.O. Oyeyemi. 2011. Evaluation of sperm motility and viability in honey included egg yolk based extenders. *Journal Global Veterynaria*. 7(1): 19-21
- [16] Rizal, M., dan Herdis. 2010. Peranan antioksidan dalam meningkatkan kualitas semen beku. *Jurnal Wartazoa*. 20(3):188-183.
- [17] Aurongzeb, M. and M.K. Azim. 2011. Antimicrobial properties of natural honey a review of literature. *J. Biochem, Mol. Biol*. 44(1):2-5.
- [18] Setiono, N., S. Sri dan E.S. Purnama. 2015. Kualitas semen beku sapi brahman dengan dosis krioprotektan gliserol yang berbeda dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 3(2):61-69.
- [19] Solihati, N., S.D. Rasad, R. Setiawan dan Nurjanah, S. 2018. Pengaruh kadar gliserol terhadap kualitas semen domba lokal. *Jurnal Biodjati*. 3(1):63-71.
- [20] Herdis, W.A. Darmawan, dan M. Rizal. 2016. Penambahan beberapa jenis gula dapat meningkatkan kualitas spermatozoa beku asal epididimis ternak domba. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 10(1):200-204.