

Fertilitas Semen Kerbau Rawa (*Bubalus bubalis carabanensis*) yang Diencerkan dengan Pengencer Nira Aren

(*FERTILITY OF SWAMP BUFFALO SEMEN (BUBALUS BUBALIS CARABANENSIS) DILUTED WITH SUGAR PALM JUICE EXTENDER*)

Muhammad Rizal*, Muhammad Riyadhhi

Laboratorium Reproduksi dan Pemuliaan Ternak, Program Studi Peternakan,
Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat,
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36 Banjarbaru 70714. Telp. 0511-4781551.
*Email: icang65@yahoo.com

ABSTRAK

Nira aren (*Arenga pinnata* Merr.) dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengencer semen karena mengandung berbagai nutrisi yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama preservasi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektivitas nira aren sebagai pengencer semen kerbau rawa dalam program inseminasi buatan (IB). Semen kerbau rawa dikoleksi menggunakan vagina buatan. Semen segar dievaluasi dan dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan pengencer laktosa yang mengandung 20% kuning telur (laktosa atau kontrol), 85% nira aren + 15% kuning telur (NAKT15), 80% nira aren + 20% kuning telur (NAKT20), dan 75% nira aren + 25% kuning telur (NAKT25). Semen yang telah diencerkan dipreservasi di dalam lemari es (*refrigerator*) pada suhu 5°C, dan dilakukan evaluasi kualitas spermatozoa meliputi: persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan membran plasma utuh (MPU). Evaluasi dilakukan setiap hari selama empat hari. Sebanyak 13 ekor kerbau betina disinkronkan estrusnya dengan menyuntikkan hormon PGF_{2α}, dan sebanyak enam ekor diinseminasi dengan perlakuan laktosa dan tujuh ekor diinseminasi dengan perlakuan NAKT20. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada hari keempat preservasi, rataan persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup perlakuan laktosa (36,67 dan 51,83%) dan NAKT20 (35,83 dan 51,5%) nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan NAKT15 (31,67 dan 44%) dan NAKT25 (30 dan 45,33%), tetapi tidak ada perbedaan antarperlakuan untuk peubah persentase MPU. Angka kebuntingan pada perlakuan laktosa adalah 66,67% dan 71,43% pada perlakuan NAKT20 ($P > 0,05$). Persentase kelahiran pada perlakuan laktosa dan NAKT20 adalah masing-masing 66,67% dan 71,43% ($P > 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa nira aren dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengencer alternatif dalam proses preservasi semen dan IB pada kerbau rawa.

Kata-kata kunci: nira aren; spermatozoa; inseminasi buatan; kerbau rawa.

ABSTRACT

Sugar palm juice (*Arenga pinnata* Merr.) can be used as semen extender because its various nutrients content which were needed for spermatozoa preservation. The objective of this research was to examine effectivity of sugar palm juice as swamp buffalo semen extender in artificial insemination (AI) program. Semen of swamp buffalo were collected by using an artificial vagina. Fresh semen were evaluated and divided in equal volume into four tubes and diluted with lactose extender containing 20% egg yolk (lactose or control), 85% sugar palm juice + 15% egg yolk (PJEY15), 80% sugar palm juice + 20% egg yolk (PJEY20), and 75% sugar palm juice + 25% egg yolk (PJEY25), respectively. Diluted-semen were preserved in refrigerator at 5°C, and quality of spermatozoa including percentages of motile spermatozoa, live spermatozoa, and intact plasma membrane (IPM) were evaluated every day for four days. A total of 13 female swamp buffaloes were estrous synchronize with PGF_{2α}, and six buffaloes were inseminated with lactose and seven buffaloes were inseminated with PJEY20. Results of this research showed that at day-four preservation, mean percentages of motile and live spermatozoa for lactose (36.67 and 51.83%) and PJEY20 (35.83 and 51.5%) were significantly ($P < 0.05$) higher than PJEY15 (31.67 and 44%) and PJEY25

(30 and 45.33%), but no difference significant between treatment for IPM parameter. Pregnancy rate for lactose was 66.67% and 71.43% for PJEY20. Percentage of birth for lactose and PJEY20 were 66.67% and 71.43%, respectively. In conclusion, sugar palm juice could be used as an alternative extender in semen preservation process and AI of swamp buffalo.

Key words: palm juice; spermatozoa; artificial insemination; swamp buffalo.

PENDAHULUAN

Inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu teknologi reproduksi yang bertujuan mengoptimalkan potensi reproduksi jantan unggul, sehingga dapat mempercepat peningkatan populasi dan perbaikan mutu genetik ternak, termasuk kerbau rawa. Hal tersebut karena salah satu teknologi yang terintegrasi dengan IB adalah teknologi pengolahan dan preservasi semen. Teknologi pengolahan dan preservasi semen (semen cair dan semen beku) bertujuan untuk meningkatkan kapasitas semen seekor pejantan unggul dalam melayani lebih banyak ternak betina dan memperpanjang daya hidup spermatozoa (Sansone *et al.*, 2000; Morrell, 2006), sehingga memiliki periode waktu yang relatif lama untuk dimanfaatkan dalam program IB. Untuk mencapai tujuan ini, semen harus diencerkan dengan bahan-bahan pengencer tertentu, yang memenuhi syarat seperti: memiliki sumber energi, bersifat penyangga, tidak toksik, mencegah kerusakan pada spermatozoa, murah, dan mudah diperoleh (Toelihere, 1993). Preservasi semen yang umum dilakukan terkait dengan upaya memperpanjang daya tahan hidup spermatozoa adalah dengan menyimpan semen yang telah diencerkan pada suhu yang lebih rendah daripada suhu tubuh (Andrabi, 2009). Semakin rendah suhu preservasi semen, semakin rendah pula derajat metabolisme sel sehingga semakin lama daya hidup spermatozoa (Lemma, 2011). Preservasi semen pada suhu rendah dalam waktu relatif lama memiliki dampak negatif yaitu dapat menyebabkan kematian spermatozoa (Watson, 2000; Batellier *et al.*, 2001; Medeiros *et al.*, 2002), baik yang disebabkan oleh pengaruh kejutan dingin (*cold shock*) akibat adanya penurunan suhu (Lessard *et al.*, 2000), kehabisan energi, maupun akibat kontaminasi dengan mikroorganisme. Untuk meminimalkan kerusakan pada spermatozoa akibat pengaruh buruk suhu rendah, pengencer semen harus mengandung berbagai komponen yang berfungsi selain untuk memperbanyak volume, tetapi juga untuk melindungi spermatozoa selama preservasi. Salah satu komponen

penting yang harus ditambahkan ke dalam pengencer adalah kuning telur. Kuning telur menjadi penting karena mengandung lesitin (fosfatidil kolin) yang berfungsi melindungi spermatozoa akibat pengaruh buruk kejutan dingin (Kayser *et al.*, 1992; White, 1993).

Selama ini yang lazim dimanfaatkan sebagai komponen pengencer semen adalah senyawa-senyawa kimia sintetik. Senyawa kimia tersebut umumnya berharga cukup mahal dan tidak mudah diperoleh di daerah-daerah tertentu, karena merupakan produk impor. Indonesia sebagai negara tropis sebenarnya memiliki berbagai macam sumber daya alam yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai bahan pengencer semen alami. Pemanfaatan berbagai bahan pengencer alternatif berbahan alami telah dilaporkan, seperti air kelapa muda pada kerbau belang (Toelihere, 1993) dan pada domba garut (Rizal *et al.*, 2006), serta ekstrak buah melon dan wortel pada domba garut (Yulnawati *et al.*, 2005).

Nira aren mengandung air 9,16%, sukrosa 84,31%, gula pereduksi 0,53%, lemak 0,11%, protein 2,28%, total mineral 3,66%, kalsium 1,35%, dan fosfor (P_2O_5) 1,37%. Kandungan kimia terbesar yang terkandung di dalam nira aren adalah kandungan sukrosa yaitu sebesar 84,31%. Kandungan sukrosa nira aren ini lebih besar jika dibandingkan kandungan sukrosa dari nira tebu (71,89%) dan nira siwalan (76,85%) (BPTP Banten, 2005). Nira aren juga mengandung vitamin A dan C serta memiliki pH 6-7, yang sesuai dengan pH semen. Fakta kandungan senyawa kimia tersebut yang menjadi landasan mengapa nira aren dapat dimanfaatkan sebagai salah bahan pengencer semen alternatif.

Pemanfaatan nira aren sebagai bahan pengencer untuk pengenceran semen kerbau rawa belum pernah dilaporkan, padahal dengan kandungan kimia yang dimiliki, nira aren berpotensi untuk dapat digunakan sebagai bahan pengencer, karena nira aren mempunyai kandungan sukrosa dan protein yang diperlukan untuk metabolisme spermatozoa. Selain itu nira aren juga mudah diperoleh dan dapat dibeli dengan harga yang relatif murah. Penelitian

ini bertujuan menguji efektivitas nira aren sebagai pengencer dalam proses preservasi semen dan IB kerbau rawa.

METODE PENELITIAN

Penampungan dan Pengolahan Semen

Semen pejantan kerbau rawa di Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIB-D) Provinsi Kalimantan Selatan, Banjarbaru ditampung menggunakan vagina buatan. Semen dikoleksi satu kali dalam satu minggu sebanyak enam kali penampungan. Selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen segar yang meliputi: volume, gerakan massa, konsistensi (kekentalan), konsentrasi, derajat keasaman (pH), persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, persentase spermatozoa abnormal, dan persentase membran plasma utuh (MPU). Kualitas semen segar yang memenuhi syarat untuk IB (persentase spermatozoa motil di atas 65%, dan persentase spermatozoa abnormal di bawah 15%) (Akhter *et al.*, 2007; Andrabi *et al.*, 2008) dan persentase MPU di atas 60% (Revell dan Mrode, 1994) diproses untuk disimpan sebagai semen cair.

Semen segar dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dengan volume yang sama, kemudian diencerkan menggunakan empat jenis pengencer berbeda sebagai perlakuan, yakni: 80% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras (Laktosa atau kontrol) sebagai kontrol, 85% nira aren + 15% kuning telur ayam ras (NAKT15), 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras (NAKT20), dan 75% nira aren + 25% kuning telur ayam ras (NAKT25). Komposisi pengencer dasar laktosa terdiri atas 9,3 g laktosa + 1,24 g fruktosa dilarutkan dengan akuabi-distilata hingga mencapai volume 100 mL. Proses penyiapan nira aren sebagai pengencer dilakukan dengan memanaskan nira aren yang baru disadap hingga mendidih kemudian disaring dengan kertas saring. Pengencer-pengencer perlakuan tersebut kemudian ditambahkan antibiotik berupa penisilin dan streptomisin masing-masing sebanyak 1.000 IU per mililiter pengencer. Spermatozoa diencerkan hingga mencapai konsentrasi 15 juta spermatozoa motil per mililiter.

Selanjutnya tabung reaksi ditutup rapat kemudian dimasukkan ke gelas piala yang berisi air bersih dan dipreservasi di dalam lemari es (*refrigerator*) yang bersuhu sekitar 5°C. Contoh masing-masing perlakuan dievaluasi kua-

litasnya setiap hari hingga persentase spermatozoa motil mencapai nilai 30%, sesuai yang dipersyaratkan dalam Standar Nasional Indonesia tahun 2008 (SNI 4869.2:2008).

Sinkronisasi Estrus Akseptor

Sebanyak 13 ekor kerbau betina betina dewasa kelamin berumur sekitar 3-5 tahun dipilih sebagai akseptor di Kelompok Tani Maju Jaya I di Desa Benua Raya, Kecamatan Bati-Bati, Kabupaten Tanah Laut, Kalimantan Selatan. Berdasarkan pengamatan, kesepuluh betina tersebut telah menunjukkan gejala-gejala estrus. Selanjutnya seluruh akseptor disinkronkan estrusnya dengan menyuntikkan preparat hormon prostaglandin F_{2a} (PGF_{2a}) merek BoVet (Jiangxi Bolai Pharmacy Co. Ltd.) dengan dosis 0,5 mg cloprostanol sodium per ekor per satu kali suntik secara intramuskuler. Setiap akseptor disuntik hormon PGF_{2a} sebanyak dua kali dengan rentang waktu penyuntikan 11 hari.

Pengamatan gejala-gejala estrus yang ditunjukkan oleh akseptor dilakukan dua hari setelah penyuntikan kedua PGF_{2a}. Pengamatan tersebut dilakukan untuk mengetahui respons akseptor terhadap perlakuan penyuntikan hormon PGF_{2a}.

Pelaksanaan IB dan Diagnosis Kebuntingan

Inseminasi buatan dilakukan terhadap betina yang menunjukkan gejala-gejala estrus tiga hari (72 jam) setelah penyuntikan hormon yang kedua. Gejala-gejala yang ditunjukkan kerbau betina estrus dalam penelitian ini adalah: vulva bengkak dan kemerahan, diam saat dinaiki betina lain atau jantan, dan keluar lendir transparan dari vulva. Sebanyak enam ekor kerbau diinseminasi dengan semen yang diencerkan dengan pengencer laktosa (kontrol) dan tujuh ekor kerbau diinseminasi dengan semen yang diencerkan pengencer 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras (NAKT20). Kedua jenis pengencer tersebut merupakan perlakuan dalam proses preservasi semen pada suhu 5°C. Semen dikemas di dalam *straw* mini (0,25 mL) yang mengandung 15 juta spermatozoa motil.

Inseminasi buatan dilakukan dengan metode rektovaginal; tangan kiri merogoh rektum kemudian memfiksir cervix uteri, sedangkan tangan kanan memegang dan memasukkan *insemination gun* ke dalam saluran reproduksi betina lewat vulva (Gambar 1). Semen umumnya dideposisikan di dalam

lumen serviks uteri (posisi 3) dan di pangkal korpus uteri (posisi 4). Setiap ekor kerbau diinseminasi dengan satu *straw*.

Peubah yang Dievaluasi

Peubah kualitas spermatozoa yang diamati adalah: persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase membran plasma utuh (MPU). Keberhasilan inseminasi buatan dievaluasi dengan mengukur persentase kebuntingan.

Persentase spermatozoa motil: persentase spermatozoa yang bergerak progresif (bergerak ke depan), dievaluasi secara subjektif pada delapan lapang pandang yang berbeda dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali (Rasul *et al.*, 2001). Angka yang diberikan berkisar antara 0 dan 100% dengan skala 5%.

Persentase spermatozoa hidup: persentase spermatozoa yang hidup. Dievaluasi dengan pewarnaan 2% eosin (Felipe-Perez *et al.*, 2008). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah (Gambar 2). Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali.

Persentase MPU: persentase spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh. Dievaluasi dengan metode *hyposmotic swelling* (HOS) *test* (Revell dan Mrode, 1994). Komposisi larutan hiposmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL. Sebanyak 200 mL larutan hiposmotik ditambahkan dengan 20 mL semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Preparat ulas tipis dibuat pada gelas objek kemudian dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali terhadap minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus (Gambar 3).

Persentase kebuntingan: jumlah betina yang bunting dibagi dengan jumlah betina yang di-IB dikali 100%. Penentuan keberhasilan IB dilakukan melalui pengamatan estrus 20-22 hari dan 41-43 hari setelah inseminasi. Kerbau betina yang menunjukkan gejala-gejala estrus seperti: vulva bengkak dan kemerahan, diam saat dinaiki betina lain atau jantan, dan keluar

lendir transparan dari vulva didiagnosis tidak bunting, sedangkan kerbau yang tidak menunjukkan gejala-gejala estrus didiagnosis bunting.

Persentase kelahiran: jumlah betina yang melahirkan dibagi dengan jumlah betina yang di-IB dikali 100%.

Analisis Data

Penelitian pengenceran semen dirancang menggunakan rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan enam kali ulangan, dan perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil pada tingkat signifikansi 0,05%. Data kebuntingan dan kelahiran diuji dengan uji *chi-square* (SYSTAT, 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar Kerbau Rawa

Hasil pengamatan didapatkan rata-rata karakteristik semen segar kerbau rawa adalah volume sebanyak 1,83 mL, konsentrasi spermatozoa 838,33 juta/mL, persentase spermatozoa motil 69,17%, persentase spermatozoa abnormal 12,17%, dan persentase MPU 86,5% (Tabel 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa semen segar yang dihasilkan oleh kerbau rawa percobaan memenuhi persyaratan kualitas untuk diolah menjadi semen cair-dingin atau semen beku. Semen segar kerbau yang memenuhi syarat untuk diolah dan digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil di atas 65%, dan persentase spermatozoa abnormal di bawah 15% (Akhter *et al.*, 2007; Andrabi *et al.*, 2008) dan persentase MPU di atas 60% (Revell dan Mrode, 1994).

Rizal *et al.* (1999) melaporkan bahwa rata-rata volume semen segar kerbau lumpur adalah 2,02 mL, konsistensi kental, gerakan massa 2-3, konsentrasi spermatozoa 1447,14 juta/mL, persentase spermatozoa motil 76,43%, persentase spermatozoa hidup 85,71%, persentase spermatozoa abnormal 12,14%, persentase MPU 85,14%. Yulnawati *et al.* (2010) melaporkan karakteristik semen segar kerbau lumpur antara lain konsentrasi spermatozoa 2.695 juta sel/mL, persentase spermatozoa motil 70%, persentase spermatozoa abnormal 6,5%, dan persentase MPU 77,5%.

Tabel 1. Rataan karakteristik semen segar kerbau rawa

Unsur	Rataan ± SD
Volume (mL)	1,83 ± 0,82
Derajat keasaman (pH)	7,1 ± 0,4
Kekentalan (konsistensi)	Encer
Gerakan massa (skala 1–3)	1,67 ± 0,26
Konsentrasi (juta/mL)	838,33 ± 147,16
Spermatozoa motil (%)	69,17 ± 2,04
Spermatozoa hidup (%)	77,67 ± 4,18
Spermatozoa abnormal (%)	12,17 ± 1,60
Membran plasma utuh (%)	86,50 ± 2,88

Kualitas Spermatozoa Kerbau Rawa Selama Preservasi pada Suhu 5°C

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer nira aren memiliki kemampuan yang kurang lebih sama dengan pengencer laktosa (kontrol) dalam mempertahankan kualitas spermatozoa kerbau rawa selama preservasi pada suhu 5°C. Pengencer laktosa dan ketiga perlakuan kombinasi antara nira aren dan kuning telur ayam ras mampu mempertahankan persentase spermatozoa motil di atas 30% hingga hari keempat penyimpanan (selama tiga

hari penyimpanan) (Tabel 2). Motilitas merupakan peubah kualitas spermatozoa paling utama dalam menentukan kelayakan semen dapat digunakan dalam program IB. Standar Nasional Indonesia menetapkan persyaratan bahwa semen kerbau yang layak digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil di atas 30% (SNI 4869.2: 2008).

Hasil pengamatan diperoleh bahwa kualitas pergerakan (motilitas) spermatozoa pada perlakuan laktosa (kontrol) dan NAKT20 lebih baik (lebih progresif) dibandingkan dengan perlakuan NAKT15 dan NAKT25. Fenomena ini berlangsung secara konstan mulai dari hari pertama hingga hari kelima preservasi. Rizal (1998) melaporkan bahwa pengencer laktosa lebih baik dalam mempertahankan kualitas semen beku kerbau lumpur dibandingkan dengan pengencer Tris dan susu skim. Hasil analisis ragam diperoleh bahwa pada hari ketiga dan keempat preservasi, rata-rata persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup pengencer laktosa dan perlakuan NAKT20 lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan NAKT15 dan NAKT25. Hal tersebut menunjukkan bahwa untuk pengencer nira aren, kombinasi terbaik adalah 80% nira ditambah 20% kuning

Tabel 2. Rataan persentase spermatozoa motil, spermatozoa hidup, dan MPU semen kerbau rawa selama preservasi pada suhu 5°C

Peubah	Perlakuan	Penyimpanan hari ke-				
		1	2	3	4	5
Spermatozoa motil (%)	Kontrol	69,17 ± 2,04 ^a	62,50 ± 2,74 ^a	51,67 ± 2,58 ^c	36,67 ± 2,58 ^c	25,83 ± 3,76 ^a
	NAKT15	69,17 ± 2,04 ^a	60,00 ± 4,47 ^a	44,17 ± 4,91 ^{ab}	31,67 ± 4,08 ^{ab}	20,00 ± 7,07 ^a
	NAKT20	69,17 ± 2,04 ^a	62,50 ± 2,74 ^a	47,50 ± 5,24 ^{bc}	35,83 ± 3,76 ^{bc}	26,67 ± 5,16 ^a
	NAKT25	69,17 ± 2,04 ^a	60,83 ± 4,91 ^a	40,83 ± 2,04 ^a	30,00 ± 5,48 ^a	22,50 ± 2,74 ^a
Spermatozoa hidup (%)	Kontrol	77,67 ± 4,18 ^a	72,17 ± 1,60 ^a	62,17 ± 3,31 ^c	51,83 ± 2,79 ^b	42,67 ± 1,63 ^b
	NAKT15	77,67 ± 4,18 ^a	70,83 ± 2,86 ^a	57,33 ± 3,26 ^{ab}	44,00 ± 1,41 ^a	32,67 ± 5,20 ^a
	NAKT20	77,67 ± 4,18 ^a	72,17 ± 1,83 ^a	59,33 ± 3,08 ^{bc}	51,50 ± 4,37 ^b	41,33 ± 3,39 ^b
	NAKT25	77,67 ± 4,18 ^a	70,17 ± 1,94 ^a	55,00 ± 4,15 ^a	45,33 ± 3,33 ^a	35,83 ± 1,83 ^a
MPU (%)	Kontrol	86,50 ± 2,88 ^a	79,83 ± 3,37 ^a	73,00 ± 5,66 ^a	64,17 ± 5,11 ^a	55,33 ± 6,19 ^b
	NAKT15	86,50 ± 2,88 ^a	71,00 ± 6,32 ^a	65,67 ± 8,04 ^a	56,67 ± 4,84 ^a	50,00 ± 3,29 ^a
	NAKT20	86,50 ± 2,88 ^a	74,83 ± 4,53 ^a	67,33 ± 5,08 ^a	62,50 ± 2,95 ^a	49,00 ± 4,65 ^a
	NAKT25	86,50 ± 2,88 ^a	75,17 ± 7,19 ^a	63,17 ± 7,03 ^a	58,33 ± 6,62 ^a	47,50 ± 1,64 ^a

^{a,b,c}Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama masing-masing peubah menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Kontrol = pengencer 80% laktosa + 20% kuning telur ayam ras
 NAKT15 = pengencer 85% nira aren + 15% kuning telur ayam ras
 NAKT20 = pengencer 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras
 NAKT25 = pengencer 75% nira aren + 25% kuning telur ayam ras
 MPU = membran plasma utuh.

telur ayam ras. Konsentrasi kuning telur di dalam pengencer yang umum digunakan pada preservasi semen kerbau adalah sebanyak 20% (Sansone *et al.*, 2000; Andrabi *et al.*, 2008). MataHine *et al.* (2014) melaporkan bahwa persentase motilitas spermatozoa sapi bali yang diencerkan dengan kombinasi 80% air buah lontar dan 20% kuning telur memiliki rata-rata 44% hingga hari keempat penyimpanan pada suhu 3-8°C, lebih baik dibandingkan dengan pengencer sitrat dan air kelapa muda.

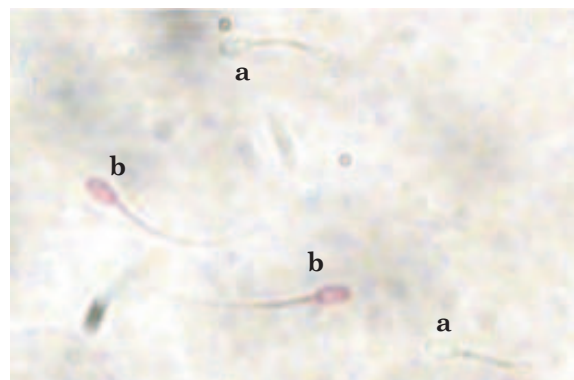
Hasil yang kurang baik pada perlakuan NAKT15 diduga karena kadar kuning telur sebanyak 15% belum cukup melindungi spermatozoa dari pengaruh *cold shock* (kejutan dingin) selama preservasi pada suhu rendah (5°C). Fosfatidil kolin (lesitin) dan kolesterol merupakan unsur penting yang terdapat di dalam kuning telur ayam untuk mencegah terjadi kejutan dingin pada spermatozoa saat

(1993) dalam proses preservasi semen pada suhu rendah (umumnya pada suhu 3-5°C dan -196°C) kerusakan spermatozoa terjadi akibat adanya pengaruh kejutan dingin yang dapat merusak membran plasma sel dan berakibat kematian spermatozoa. Untuk menekan kerusakan sel akibat pengaruh buruk suhu rendah, maka upaya yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan zat tertentu, seperti senyawa krioprotektan dan kuning telur ke dalam pengencer semen (Kayser *et al.*, 1992). Hasil berbeda dilaporkan Fatih *et al.* (2010) bahwa konsentrasi kuning telur 15% lebih baik dibandingkan dengan 10 dan 20% dalam mempertahankan kualitas semen beku kerbau Kundhi.

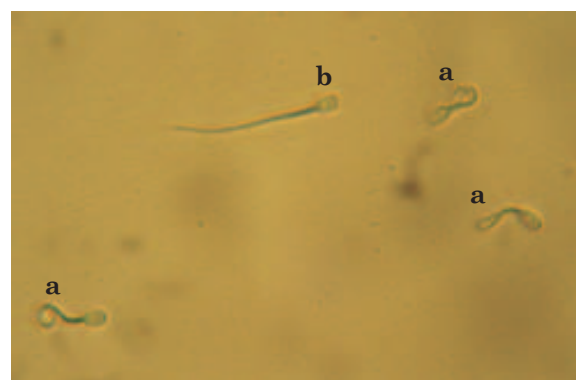
Pada perlakuan NAKT25 diduga konsentrasi 25% kuning telur terlalu tinggi sehingga media pengencer lebih kental, sehingga menghambat pergerakan (motilitas) spermatozoa. Menurut Bathgate *et al.* (2006) kuning telur dalam konsentrasi tinggi di dalam pengencer



Gambar 1. Inseminasi buatan metode rektovaginal pada kerbau rawa dilakukan di Desa Benua Raya, Kecamatan Bati-Bati, Kabupaten Tanah Laut, Kalimantan Selatan.



Gambar 2. Spermatozoa hidup kerbau rawa, kepala berwarna putih (a) dan spermatozoa mati, kepala berwarna merah (b).



Gambar 3. Spermatozoa kerbau rawa dengan membran plasma utuh, ekor melingkar (a) dan membran plasma rusak, ekor lurus (b).

semen dapat menimbulkan efek toksisitas akibat meningkatnya aktivitas oksidasi asam amino yang menyebabkan kematian spermatozoa. Peningkatan efek toksisitas akibat tingginya konsentrasi kuning telur di dalam pengencer semen diduga karena tingginya konsentrasi hidrogen peroksida yang terbentuk. Ferdinand *et al.* (2014) bahwa konsentrasi kuning telur sebanyak 10% lebih baik dibandingkan dengan 15, 20, 25, dan 30% dalam proses preservasi semen sapi FH pada suhu 5°C.

Hasil pengukuran derajat keasaman (pH) semen yang telah diencerkan menunjukkan bahwa hingga hari kelima preservasi tidak terjadi penurunan pH yang drastis (Tabel 3). Hal tersebut menunjukkan bahwa selama preservasi terjadi dua indikasi, yakni: bahan-bahan pengencer tidak mengalami kerusakan yang parah dan derajat metabolisme spermatozoa rendah. Diketahui bahwa dalam kondisi penyimpanan anaerob (tanpa oksigen) seperti pada penelitian ini, proses metabolisme sel berlangsung hanya tahap glikolisis yang hasil akhirnya adalah asam laktat. Jika derajat metabolisme berlangsung tinggi, akan terjadi penumpukan asam laktat di dalam media sehingga pH media turun dan berakibat pada kematian spermatozoa. Khusus untuk pengencer nira aren, hingga hari kelima preservasi pH media berkisar antara 6,7 dan 6,9 (relatif stabil dibandingkan dengan pH pada hari pertama sebesar 7,1) yang menunjukkan bahwa nira aren tidak mengalami proses fermentasi, sehingga tetap dapat menyediakan substrat sumber energi dan sekaligus melindungi spermatozoa selama preservasi. Menurut Toelihere (1993) pH sangat memengaruhi daya tahan hidup spermatozoa. Spermatozoa kerbau hidup dengan baik di dalam media dengan pH 6-8 (Rasul *et al.*, 2000). Penurunan atau peningkatan pH eksternal yang selanjutnya memodifikasi pH intraseluler dapat memengaruhi motilitas spermatozoa (Contri *et al.*, 2013). Derajat keasaman yang tetap bertahan di sekitar netral selama hari kelima preservasi selain menguntungkan bagi motilitas spermatozoa, juga baik bagi integritas membran plasma sel, karena menurut (Contri *et al.*, 2013) penyimpanan semen pada pH yang rendah (5,5) selain menghambat motilitas juga mengubah integritas membran plasma sel spermatozoa. Keutuhan membran plasma sel penting karena membran plasma berperan ganda, yakni melindungi organel-organel sel dari perusakan secara mekanik dan secara biokemik. Membran

plasma mengatur lalu lintas masuk dan keluar sel seluruh substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme.

Substrat sumber energi yang tetap tersedia di dalam media pengencer selama penyimpanan akan menjamin berlangsungnya proses glikolisis untuk menghasilkan energi berupa adenosin trifosfat (ATP), sehingga pergerakan (motilitas) spermatozoa dapat dipertahankan. Preservasi semen dalam kondisi tanpa oksigen seperti pada penelitian ini, suplai ATP bagi spermatozoa terutama disuplai melalui jalur glikolisis (Barbonetti *et al.*, 2010). Suatu eksperimen menunjukkan bahwa glikolisis dapat mengimbangi kekurangan produksi ATP oleh mitokondria dalam mempertahankan motilitas spermatozoa menciit, dan gangguan terhadap mitokondria dapat menekan motilitas spermatozoa hanya ketika proses glikolisis terhambat (Mukai dan Okuno, 2004). Dengan demikian, penghambatan proses glikolisis akan menyebabkan kematian spermatozoa.

Berdasarkan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa nira aren memiliki kemampuan yang sama dengan pengencer semen berbahan dasar kimiawi sintetik dalam melindungi spermatozoa kerbau rawa selama preservasi pada suhu 5°C, temuan ini merupakan suatu capaian yang sangat berarti. Nira aren mengandung berbagai zat nutrisi seperti karbohidrat, protein, vitamin A, dan vitamin C yang berperan sebagai substrat sumber energi dan pelindung bagi spermatozoa selama preservasi. Salah satu syarat pengencer semen adalah di dalamnya terkandung karbohidrat sebagai sumber energi (Toelihere, 1993), sedangkan vitamin C berfungsi sebagai senyawa antioksidan untuk melindungi membran plasma sel spermatozoa dari kerusakan akibat peroksidasi lipid (Beconi *et al.*, 1993; Aurich *et al.*, 1997). Potensi nira aren di daerah tropis seperti Indonesia cukup besar dengan harga yang relatif murah, sehingga jika digunakan sebagai bahan pengencer semen akan menekan biaya produksi dibandingkan dengan menggunakan bahan-bahan kimiawi sintetik yang harganya mahal dan relatif sulit diperoleh. Menurut Toelihere (1993) salah satu syarat bahan pengencer semen adalah murah dan mudah diperoleh.

Respons Betina terhadap Penyuntikan Hormon PGF_{2a}

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa 13 ekor (100%) kerbau betina yang disuntik dengan hormon PGF_{2a} menunjukkan gejala-gejala

Tabel 3. Rataan pH semen kerbau rawa yang telah diencerkan selama preservasi

Perlakuan	Penyimpanan hari ke-				
	1	2	3	4	5
Kontrol	7,10 ± 0,40	6,80 ± 0,00	6,60 ± 0,17	6,20 ± 0,00	6,13 ± 0,06
NAKT15	7,10 ± 0,40	6,97 ± 0,06	7,03 ± 0,06	6,90 ± 0,01	6,90 ± 0,01
NAKT20	7,10 ± 0,40	6,97 ± 0,11	6,90 ± 0,10	6,77 ± 0,06	6,73 ± 0,06
NAKT25	7,10 ± 0,40	6,73 ± 0,06	6,73 ± 0,06	6,73 ± 0,06	6,70 ± 0,00

Kontrol = pengencer 80% laktosa + 20% kuning telur ayam ras
 NAKT15 = pengencer 85% nira aren + 15% kuning telur ayam ras
 NAKT20 = pengencer 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras
 NAKT25 = pengencer 75% nira aren + 25% kuning telur ayam ras.

Tabel 4. Persentase kebuntingan dan kelahiran hasil inseminasi buatan (IB) pada kerbau rawa

Perlakuan	Kebuntingan (%)	Kelahiran (%)
Kontrol	66,67	66,67
NAKT20	71,43	71,43

Kontrol = pengencer 80% laktosa + 20% kuning telur ayam ras
 NAKT20 = pengencer 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras.

estrus dua hari setelah penyuntikan PGF_{2a} kedua. Gejala-gejala estrus yang ditunjukkan oleh betina-betina tersebut adalah saling menaiki sesama betina, diam saat dinaiki oleh betina lain, dan keluarnya lendir transparan dari dalam vagina, terutama ketika rektum dirogoh pada saat pelaksanaan IB. Gejala-gejala estrus umumnya mulai ditunjukkan oleh betina pada hari kedua setelah penyuntikan hormon PGF_{2a} yang kedua. Hal tersebut menunjukkan bahwa hormon PGF_{2a} yang disuntikan efektif dalam menyerentakkan estrus pada sekelompok betina. Menurut Toelihere (1993) betina yang sedang estrus menampilkan beberapa macam gejala, seperti: sering mengeluarkan urin, nafsu makan turun, sering mengeluarkan suara khas, saling menaiki sesama betina, keluarnya lendir transparan dari dalam vagina lewat vulva, dan diam saat dinaiki betina lain. Sianturi *et al.* (2010) melaporkan bahwa kerbau betina yang disuntik dengan hormon PGF_{2a} atau kombinasi antara hormon PGF_{2a} dan *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) serta kombinasi

antara hormon PGF_{2a} dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) menghasilkan persentase estrus sebanyak 100%, dan gejala-gejala estrus mulai terlihat pada hari kedua setelah penyuntikan hormon PGF_{2a} yang kedua.

Respons estrus sebanyak 100% juga menunjukkan bahwa seluruh kerbau betina akseptor memiliki kondisi reproduksi yang baik karena berlangsung secara siklik dan teratur, khas pada kerbau sekitar 20-22 hari. Menurut Brito *et al.* (2007) respons pemberian hormon PGF_{2a} terhadap ternak akan efektif jika siklus estrus berlangsung teratur dan terdapat *corpus luteum* (CL) dalam fase luteal (sekitar 17 hari dari masa siklus estrus selama 20-22 hari). Hal tersebut terjadi karena PGF_{2a} melisis CL. Penurunan kadar progesteron yang drastis akibat lisisnya CL, akan menghilangkan umpan balik negatif yang memicu kelenjar hipotalamus melepaskan hormon gonadotropin berupa GnRH. Selanjutnya GnRH merangsang kelenjar hipofisis anterior untuk mensekresikan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH). *Follicle stimulating hormone* merangsang perkembangan folikel hingga mencapai ukuran dominan yang pada akhirnya meningkatkan sekresi hormon estrogen dan merangsang terjadinya estrus. *Luteinizing hormone* merangsang terjadinya ovulasi pada folikel yang telah mencapai ukuran folikel preovulatori (Senger 1999). Hal tersebut juga yang dapat menjelaskan mengapa estrus muncul relatif serentak pada semua kerbau betina setelah penyuntikan hormon PGF_{2a} karena setelah penyuntikan kedua, semua kerbau betina telah memiliki CL yang memberi respons terhadap hormon PGF_{2a}.

Persentase Kebuntingan dan Kelahiran Hasil IB

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap siklus estrus selama dua periode berturut-turut setelah pelaksanaan IB menunjukkan bahwa empat ekor (66,67%) dari enam ekor betina yang di-IB tidak lagi memperlihatkan gejala-gejala estrus dan didiagnosis telah bunting untuk perlakuan pengencer kontrol (laktosa) dan lima ekor (71,43%) dari tujuh ekor yang di-IB untuk perlakuan pengencer 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras (NAKT20) ($P>0,05$). Persentase kelahiran yang diperoleh sama dengan hasil diagnosis kebuntingan, yakni 66,67% untuk perlakuan pengencer laktosa dan 71,43% untuk perlakuan pengencer NAKT20 ($P>0,05$) (Tabel 4).

Hasil kebuntingan dan kelahiran yang diperoleh menunjukkan bahwa nira aren layak menjadi bahan pengencer semen alternatif pada kerbau rawa karena mampu mempertahankan fertilitas spermatozoa setelah proses pengenceran, dengan hasil yang sama dengan pengencer semen berbasis bahan kimia sintetik, yang selama ini lazim digunakan sebagai bahan pengencer semen pada berbagai jenis ternak. Hasil yang diperoleh juga mengonfirmasikan bahwa metode sinkronisasi estrus yang diaplikasikan dapat menginisiasi terjadinya berbagai mekanisme fisiologi seperti foliklogenesis, ovulasi, transportasi spermatozoa dan oosit, fertilisasi, serta sintesis dan sekresi hormon-hormon yang terlibat langsung dalam meregulasi berbagai kegiatan reproduksi. Menurut Barile (2005) keberhasilan IB dipengaruhi oleh beberapa faktor, dan yang utama adalah kondisi reproduksi ternak betina resipien, kualitas semen yang diinseminasikan, ketepatan deteksi estrus, serta keterampilan dan penanganan semen yang benar sehingga kualitas semen tetap terjaga hingga diinseminasikan ke ternak betina.

Persentase kebuntingan yang diperoleh dalam penelitian ini kurang lebih sama dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Sianturi *et al.* (2010) melaporkan persentase kebuntingan sebesar 66,7-75% pada kerbau rawa di Banten yang di-IB dengan semen beku yang diencerkan dengan pengencer laktosa mengandung 20% kuning telur itik + 1 mM glutation. Angka kebuntingan hasil IB pada kerbau sebanyak 40-60% (Barile, 2005), 53% (Andrabi *et al.*, 2006), 41,5-56% pada kerbau sungai (Akhter *et al.*, 2012), serta 58,55-60% (Akhter *et al.*, 2007), 47% (Akhter *et al.*,

2010), dan 43-56% (Ansari *et al.*, 2016) pada kerbau Nili-Ravi. Persentase kebuntingan kerbau lumpur yang di-IB dengan spermatozoa epididimis kerbau belang *pascathawing* berkisar antara 37,5% dan 40% (Yulnawati *et al.*, 2013).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut bahwa nira aren dapat dimanfaatkan sebagai bahan pengencer alternatif dalam proses preservasi semen kerbau rawa pengganti bahan pengencer berbasis bahan kimiawi sintetik. Pengencer laktosa dan kombinasi 80% nira aren + 20% kuning telur ayam ras merupakan pengencer terbaik untuk semen kerbau rawa, serta menghasilkan persentase kebuntingan dan kelahiran yang cukup tinggi. Seluruh pengencer perlakuan mampu mempertahankan kualitas semen kerbau rawa yang memenuhi syarat dimanfaatkan dalam program IB selama tiga hari preservasi pada suhu 5°C. Metode penyuntikan hormon PGF_{2 α} dua kali dengan rentang waktu 11 hari efektif menyerentakkan estrus pada kerbau rawa.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan agar nira aren dimanfaatkan sebagai bahan pengencer dalam proses preservasi semen kerbau rawa dalam pelaksanaan program IB, sehingga biaya pengolahan semen lebih murah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Hibah Bersaing yang dibiayai oleh Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi tahun anggaran 2015 dengan kontrak nomor: 056/UN8.2/PL/2015. Penulis juga mengucapkan terima kasih pada peternak kerbau rawa (Kelompok Tani Suka Maju 1) di Desa Benua Raya, Kecamatan Bati-Bati Kabupaten Tanah Laut, Kepala dan Staf Balai Penyuluhan Pertanian, Perikanan, dan Kehutanan (BP3K), Kecamatan Bati-Bati, serta Kepala dan Staf Balai Inseminasi Buatan Daerah Provinsi Kalimantan Selatan, Banjarbaru atas segala bantuannya sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhter S, Sajjad M, Andrabi SMH, Ullah N, Qayyum M. 2007. Effect of antibiotics in extender on fertility of liquid buffalo bull semen. *Pakistan Vet J* 27: 13-16
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Iqbal N, Ullah N. 2010. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology* 74: 951-955.
- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Ullah N, Khalid M. 2012. Soya-lecithin in extender improves the freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 47: 815-819.
- Andrabi SMH. 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 44: 552-569.
- Andrabi SMH, Siddique M, Ullah N, Khan LA. 2006. Effect of reducing sperm numbers per insemination dose on fertility of cryopreserved buffalo bull semen. *Pakistan Vet J* 26: 17-19.
- Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 104: 427-433.
- Ansari MS, Rakha BA, Malik MF, Andrabi SMH, Ullah N, Iqbal R, Holt WV, Akhter S. 2016. Effect of cysteine addition to the freezing extender on the progressive motility, viability, plasma membrane and DNA integrity of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *J Applied Animal Research* 44: 36-41.
- Aurich JE, Schnoherr U, Hoppe H, Aurich C. 1997. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-store stallion semen. *Theriogenology* 48: 841-851.
- Barbonetti A, Vassallo MRC, Fortunato D, Francavilla S, Maccarrone M, Francavilla F. 2010. Energetic metabolism and human sperm motility: impact of CB1 receptor activation. *Endocrinology* 151: 5882-5892.
- Barile VL. 2005. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. *Livestock Reprod Sci* 92: 183-194.
- Batellier F, Vidament M, Fauquant J, Duchamp G, Arnaud G, Yvon JM, Magistrini M. 2001. Advances in cooled semen technology. *Anim Reprod Sci* 68: 181-190.
- Bathgate R, Maxwell WMC, Evans G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41: 68-73.
- Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Afranchino MA. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen. *Theriogenology* 40: 841-851.
- BPTP Banten. 2005. Kajian Sosial Ekonomi Gula Aren di Banten. Serang: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Banten.
- Brito LFC, Satrapa R, Marson EP, Kastelic JP. 2002. Efficacy of PGF₂α to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. *Anim Reprod Sci* 3: 23-35.
- Contri A, Gloria A, Robbe D, Valorz C, Wegher L, Carluccio A. 2013. Kinematic study on the effect of pH on bull sperm function. *Anim Reprod Sci* 136: 252-259.
- Fatih A, Samo MU, Marghazani IB, Nasrullah MAK, and Nawaz A. 2010. Effect of different egg yolk levels on post thaw quality of Kundhi buffalo bull semen. *Revista Veterinaria* 21 Issue 1, p864.
- Felipe-Perez YE, Juarez-Mosqueda ML, Hernandez-Gonzalez EO, Valencia JJ. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Vet Bras* 2: 123-130.
- Ferdinand N, Ngwa TD, Augustave K, Dieudonne BPH, Willington BO, D'Alex TC, Pierre K, and Joseph T. 2014. Effect of egg yolk concentration in semen extender, pH adjustment of extender and semen cooling methods on bovine semen characteristics. *Global Veterinaria* 12: 292-298.
- Kayser JP, Amann RP, Shidefer RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW. 1992. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 30: 601-614.

- Lemma A. 2011. Effect of cryopreservation on sperma quality and fertility. In: M. Manafi (editor). Artificial Insemination in Farm Animals, pp:191-216.
- Lessard C, Parent S, Leclerc P, Bailey JL, Sullivan R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J Androl* 21: 700-707.
- MataHine T, Burhanuddin, Marawali A. 2014. Efektivitas air buah lontar dalam mempertahankan motilitas, viabilitas dan daya tahan hidup spermatozoa sapi bali. *J Veteriner* 15: 263-273.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveria ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- Morrell JM. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod Dom Anim* 41: 63-67.
- Mukai C, Okuno M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod* 71: 540-547.
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl* 22: 278-283.
- Rasul Z, Anzar M, Jalali S, Ahmad N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 59: 31-41.
- Revell SG, Mrode RA. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 36: 77-86.
- Rizal M. 1998. Efektivitas Plasma Semen Sapi dan Berbagai Pengencer dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*). Tesis. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Situmorang P. 1999. Pengaruh plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). *J Ilmu Ternak dan Veteriner* 4: 143-147.
- Rizal M, Achjadi RK, Herdis, Surachman M, Yulnawati. 2006. Kriopreservasi semen domba garut menggunakan pengencer air kelapa muda. Prosiding Seminar Nasional Peranan Bioteknologi Reproduksi dalam Pembangunan Peternakan dan Perikanan di Indonesia. Fakultas Kedokteran Hewan dan Program Studi Biologi Reproduksi, Institut Pertanian Bogor. Bogor, 8 April 2006. Hlm 69-72.
- Sansone G, Nastri MJF, Fabbrocini A. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim Reprod Sci* 62: 55-76.
- Senger PL. 1999. Pathways to Pregnancy and Parturition. Pullman: Current Conception Inc.
- Sianturi RG, Kusumaningrum DA, Adiati U, Triwulanningsih E, Situmorang P. 2010. Efektivitas beberapa metode sinkronisasi estrus dan inseminasi buatan pada kerbau rawa di Banten. Prosiding Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau 2010. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, Kementerian Pertanian, Bogor. Hlm 76-83.
- Standar Nasional Indonesia (SNI). 2008. Semen Beku Kerbau. Badan Standarisasi Nasional, Jakarta.
- SYSTAT. 1996. Statistics (Version 6.0 for Windows), SPSS. Chicago, IL, USA.
- Toelihere MR. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Bandung: Angkasa.
- Watson PF. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60: 481-92.
- White IG. 1993. Lipid and Ca uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: A review. *Reprod Fertil Dev* 5: 639-658.
- Yulnawati, Setiadi MA, Herdis. 2005. Pemanfaatan sari buah melon dan sari wortel sebagai media pengencer alternatif semen cair domba Garut. *Protein* 12: 151-160.
- Yulnawati, Gunawan M, Maheshwari H, Rizal M, Herdis, Boediono A. 2010. Quality of ejaculated and epididymal sperms spotted buffalo in dextrose supplemented extender. *Hayati* 17: 27-30.
- Yulnawati, Maheshwari H, Rizal M, Boediono A. 2013. Frozen-thawed epididymal sperm quality and the success rate of artificial insemination in spotted buffaloes (*Bubalus bubalis carabanensis*). *Buffalo Bulletin* (Special Issue 2) 32: 494-497.