

Penambahan *Bovine Serum Albumin* pada *Beltsville Thawing Solution* Dapat Mempertahankan Kualitas Semen Babi yang Disimpan pada 15°C

(*ADDITION OF BOVINE SERUM ALBUMIN TO BELTSVILLE THAWING SOLUTION
COULD MAINTAIN QUALITY OF PIG SEMEN STORED AT 15°C*)

Wayan Bebas¹, Wayan Gorda²

¹Lab Reproduksi Veteriner, ²Lab Ilmu Bedah Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.
Jln. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234
Telpon 0361 223791; E-mail w_bebas@unud.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempertahankan kualitas semen babi selama penyimpanan pada suhu 15°C, dalam upaya menunjang program inseminasi buatan dengan penambahan *Bovine Serum albumin* (BSA) pada pengencer *Beltsville Thawing Solution* (BTS). Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan lima kelompok perlakuan masing masing To = semen diencerkan dengan BTS tanpa penambahan BSA; T1 = dengan penambahan 5 mg BSA/mL pengencer; T2= dengan penambahan 10 mg BSA/mL pengencer ; T3 = dengan penambahan 15 mg BSA/mL pengencer; T4 = dengan penambahan 20 mg BSA/mL pengencer. Masing masing perlakuan diulang sebanyak lima kali sehingga jumlah sampel yang digunakan sebanyak 25. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 15°C selama 72 jam lalu dilakukan pengamatan kualitas semen meliputi: motilitas progresif ((MP), daya hidup (DH), abnormalitas, dan membran plasma utuh (MPU). Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam, data antar perlakuan yang berbeda dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan, penambahan BSA konsentrasi 10 mg/mL dan 15 mg/mL pengencer memberikan pengaruh yang sama baiknya terhadap kualitas semen dan nyata lebih baik ($p < 0,05$) jika dibandingkan penambahan konsentrasi 0 mg/mL, 5 mg/mL, dan 20 mg/mL pengencer. Dapat disimpulkan, penambahan BSA 10 mg/mL pada pengencer BTS dapat mempertahankan kualitas semen babi paling optimal terhadap MP, DH, abnormalitas dan MPU.

Kata-kata kunci: BSA; BTS; kualitas semen babi; penyimpanan 15°C.

ABSTRACT

This study aims to maintain the quality of pig semen for longer during storage at 15°C, in an effort to support artificial insemination programs with the addition of Bovine Serum albumin (BSA) to diluent Beltsville Thawing Solution (BTS). This study uses a completely randomized design with five treatment groups, each To = semen was diluted with BTS without the addition of BSA ; T1 = with the addition of 5 mg BSA/mL diluent; T2 = with the addition of 10 mg BSA/mL diluent; T3 = with the addition of 15 mg BSA/mL diluent; T4 = with the addition of 20 mg BSA/mL diluent. Each treatment was repeated five times so that the number of samples used was twenty-five. The diluted cement is stored at 15°C for 72 hours then observing the quality of cement includes: progressive motility, dead spermatozoa, abnormalities, and intact plasma membranes. The data obtained were analyzed by analysis of variance, if there were differences followed by Duncan's test. The results showed, addition of BSA concentration of 10 mg/mL and 15 mg/mL of diluent gives the same effect on the quality of cement during storage and significantly better ($p < 0.05$) when compared to the addition of 0 mg/mL, 5 mg/mL and 20 mg/mL diluents. It can be concluded, the addition of BSA 10 mg/mL BTS diluents can maintain the most optimal quality of pig semen against progressive motility, dead spermatozoa, abnormalities and intact plasma membranes

Keywords: BSA; BTS; pig semen quality; 15°C storage.

PENDAHULUAN

Inseminasi buatan atau di masyarakat lebih dikenal dengan kawin suntik merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang telah dikembangkan di Indonesia secara komersial dengan menggunakan semen segar atau semen yang disimpan pada suhu dingin (Wagner dan Thibier, 2000). Semen babi mempunyai karakteristik tersendiri dibandingkan dengan hewan domestik lainnya: produksi semen volume besar dan sangat sensitif terhadap *colldshock*, daya hidup sel spermatozoa secara dramatis berkurang bila terpapar suhu di bawah 15°C (Gilmore *et al.*, 1996; Holt, 2000; Watson, 2000). Sensitivitasnya ini sangat terkait dengan komposisi lipid dari membran plasma spermatozoa yang mengandung *polyunsaturated fatty acid* (PUFA) tinggi seperti : *docosahexaenoic acid* (DHA) dan *docosapentaenoic acid* (DPA), dan memiliki rendah kolesterol (Johnson dan Weitze, 2000). Selama proses penyimpanan dingin, PUFA menurun secara dramatis akibat terjadi proses peroksidasi lipid, spermatozoa diserang oleh *reactive oxygen species* (ROS) (Sikka, 2001). Sumber utama pembentukan ROS adalah spermatozoa abnormal, yang mati dan yang mengalami kerusakan (Silva *et al.*, 2012). Pembentukan ROS yang berlebihan akan memengaruhi motilitas spermatozoa, kerusakan pada *mid-piece* dan fusi terhadap sel telur (Chatterjee *et al.*, 2001; Agarwal dan Said, 2005). Penambahan senyawa antioksidan kedalam pengencer dapat meminimalkan pembentukan ROS dan melindungi fungsi membran plasma (Peña *et al.*, 2003; Gadea *et al.*, 2004; Maldjian *et al.*, 2005).

Bovine Serum Albumin (BSA) merupakan salah satu bahan yang di dalamnya mengandung *growth factor* yang sekarang banyak digunakan di laboratorium untuk menumbuhkan sel dan *in vitro fertilization/IVF* (Tanaka *et al.*, 2000). Bakst dan Cecil (1992) telah membuktikan penambahan BSA (BSA Fraction V) untuk mengencerkan semen kalkun yang disimpan pada suhu 7°C dapat meningkatkan motilitas spermatozoa, dan kemampuannya untuk membuahi. *Bovine Serum Albumin* juga dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan seluler karena dapat menghubungkan ion logam transisional (Fe^{2+} dan Cu^{+}), sehingga meminimalisir pembentukan radikal OH (Anghals *et al.*, 2010). Albumin serum menyebabkan inaktivasi metabolisme toksik

dari produksi oksigen radikal bebas dan menyatukan komponen yang lain, seperti steroid, vitamin, dan asam lemak (Luvoni *et al.*, 2004). Konsentrasi BSA yang ditambahkan ke dalam pengencer semen domba agar menguntungkan terhadap kualitas semen selama penyimpanan adalah sebesar 5 mg/mL pengencer, peningkatan konsentrasi 10-20 mg/mL pengencer berdampak buruk terhadap kualitas semen karena terjadi peningkatan tekanan osmose pada pengencer (Anghel *et al.*, 2010). Namun, menurut Azawi dan Husein (2011) penambahan 10 mg/mL pengencer pada semen domba berdampak baik terhadap kualitas semen selama penyimpanan.

Beltsville Thowing Solution (BTS^a, Minitub, Germany) merupakan salah satu pengencer yang telah diperjualbelikan secara global yang diproduksi dan digunakan untuk pengencer semen babi. *Beltsville Thowing Solution* memiliki komposisi dalam (gram/liter): 37,15 g D-glucose, Tri-sodium citrate 6,00 g, EDTA disodium salt 1,25 g, sodium hydrogen carbonate 1,25 g, potassium chloride 0,75 g, gentamycin 50 mg, streptomycin sulfate 1 g, penicillin G crystalline 10⁶ IU, tekanan osmose 330 Mosm, dengan pH 7,2 (Thompson, 2005). Fungsi dari masing-masing komposisi adalah: EDTA : untuk menghambat dari kerja Ca. Calcium berfungsi sebagai mediator dalam proses kapasitasi dan reaksi dari akrosoma. Potassium: akan masuk ke intraseluler melalui pompa potassium sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa. Citrate dan bicarbonat sebagai kontrol pH. Glukosa sebagai sumber makanan. melalui proses glikolisis. Streptomycin, penicillin, dan gentamycin untuk membunuh kuman (Gadea, 2003). Penelitian ini bertujuan untuk mempertahankan kualitas semen babi selama penyimpanan pada suhu 15°C, dalam upaya menunjang program inseminasi buatan dengan penambahan BSA pada pengencer *Beltsville Thawing Solution* (BTS).

METODE PENELITIAN

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap dengan lima kelompok perlakuan pengencer semen masing-masing: To = pengencer BTS tanpa penambahan BSA; T₁ = pengencer BTS + 5 mg BSA/mL pengencer; T₂ = pengencer BTS + 10 mg BSA/mL pengencer; T₃ = pengencer BTS + 15 mg BSA/mL pengencer, T₄ = pengencer BTS + 20 mg BSA/mL pengencer. Pada tiap-

tiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak lima kali, sehingga jumlah sampel yang digunakan sebanyak 25 buah. Semen yang telah diencerkan disimpan pada suhu 15°C selama 72 jam. Selama proses penyimpanan, semen-semen tersebut dihomogkan setiap 12 jam untuk menghindari pengendapan bahan-bahan pengencer.

Pada masing-masing perlakuan, dilakukan pengamatan terhadap spermatozoa dalam hal: motilitas, daya hidup, abnormalitas dan membran plasma utuh. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam dan data yang berbeda, dianalisis lebih lanjut dengan uji Duncan.

Hewan Coba dan Penampungan Semen

Hewan coba yang digunakan adalah babi *landrace* umur 1,5 tahun dalam keadaan sehat dan sudah terlatih ditampung semennya menggunakan metode *massage* dengan frekuensi penampungan dua kali seminggu. Semen hasil penampungan segera ditaruh pada penangas air/*water bath* suhu 37°C untuk selanjutnya dievaluasi kualitas semennya (Hu *et al.*, 2006).

Evaluasi Semen Babi

Pemeriksaan Makroskopis. Semen yang telah ditampung dihomogenkan, dan dilakukan pemeriksaan makroskopis berupa pemeriksaan volume, pH, konsistensi/kekentalan, dan bau. Semen yang telah ditampung dengan *beaker glass* dibaca volumenya, pH diukur menggunakan pH meter dengan cara mencelupkan alat pemindai/*probe* kedalam semen lalu dibaca hasilnya. Konsistensi semen atau kekentalan semen diukur dengan cara memasukkan semen kedalam tabung reaksi kemudian tabung dimiringkan sehingga semen membasahi permukaan tabung, kemudian diamati bagaimana proses penurunan semen yang membasahi dinding tabung. Semen dengan kualitas jelek, proses penurunan semen pada permukaan dinding tabung seperti air. Warna semen diamati secara langsung, dan bau semen dinilai dengan mencium aroma semen yang timbul.

Pemeriksaan Mikroskopis. Pemeriksaan mikroskopis meliputi: gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi spermatozoa. Pemeriksaan gerakan massa dilakukan dengan

cara meneteskan satu tetes semen segar (0,05 mL) di atas gelas objek kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 kali. Hasil pengukuran gerakan massa dinilai menurut Toelihere (1993): ++++ (sangat baik), +++ (baik), ++ (sedang), + (jelek), - (aspermia).

Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara meneteskan semen sebanyak 0,05 mL di atas gelas objek hangat (37°C) lalu ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali. Selanjutnya dilakukan penghitungan terhadap spermatozoa yang mempunyai pergerakan progresif dalam satuan persen, pengamatan dilakukan terhadap lima lapang pandang (Breininger *et al.*, 2005). Penghitungan konsentrasi spermatozoa menggunakan alat hemositometer Thoma. Cara kerjanya seperti yang diuraikan Toelihere (1993).

Penyiapan Pengencer BTS

Beltsville Thowing Solution dalam kemasan saset plastik yang berisi 50 g BTS kristal dilarutkan dalam 1000 mL aquadestilata pada suhu 37°C, lalu dihomogenkan dengan jalan menggoyang-goyangkannya. Setelah homogen ditaruh dalam penangas air bersuhu 37°C. Masing-masing perlakuan dilakukan penambahan BSA masing masing: 0 mg/mL pengencer (T0); 5 mg/mL pengencer (T1); 10 mg/mL pengencer, dan 20 mg/mL pengencer.

Pengenceran Semen Babi

Semen babi yang telah ditampung ditaruh dalam penangas air suhu 37°C. Pengencer dengan berbagai jenis konsentrasi BSA juga diletakkan dalam penangas air suhu 37°C, bertujuan untuk menyamakan suhu pengencer dengan suhu semen. Kemudian semen diencerkan dengan konsentrasi spermatozoa 10⁹/mL.

Penyimpanan Semen Babi pada Suhu 15°C.

Semen babi yang telah diencerkan disimpan pada suhu 15°C selama 72 jam. Setiap 12 jam selama penyimpanan semen babi, dilakukan penghomogenan semen dengan cara menggoyang-goyangkannya secara perlahan agar komponen pengencer dan spermatozoa tidak mengendap.

Evaluasi Semen Babi Setelah Penyimpanan

Pemeriksaan motilitas progresif dilakukan sesuai dengan cara yang dilakukan Breininger *et al.* (2005). Pemeriksaan daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pengecatan eosin-negrosin menurut Kvist dan Bjořndahl (2002). Pewarna Eosin-Negrosin disiapkan dengan mencampurkan 6,7 g/L Eosin Y dan 9 g/L Nigrosin dalam 9 g/L sodium chloride. Selanjutnya dilakukan pencampuran 50 µL semen babi dengan 50 µL eosin-nigrosin, lalu dihomogenkan. Setelah 30 detik, dibuat preparat ulas dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, dan diamati di bawah mikroskop cahaya pembesaran 450 kali terhadap 200 sel spermatozoa. Sel spermatozoa yang mati teramati berwarna merah, sedangkan yang masih hidup teramati bening tidak terwarnai. Dilakukan penghitungan terhadap spermatozoa yang mati dan yang hidup dalam satuan persen. Pemeriksaan abnormalitas spermatozoa dilakukan dengan teknik yang sama dengan pemeriksaan daya hidup spermatozoa dengan pengecatan eosin-negrosin menurut Kvist dan Bjořndahl (2002). Sel spermatozoa yang mengalami bentuk abnormalitas baik pada bagian kepala, badan dan ekor dihitung persentasenya.

Persentase MPU spermatozoa dievaluasi dengan metode *hyposmotic swelling (HOS) test* (Zamfirescu *et al.*, 2001). Komposisi larutan hiposmotik terdiri atas: 0,9 g fruktosa + 0,49 g natrium sitrat yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 mL (100 mOsm/kg). Sebanyak 20 mL larutan hiposmotik ditambahkan dengan 0,2 mL semen dan dicampur hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Semen babi diteteskan pada gelas objek lalu ditutup dengan gelas penutup, kemudian evaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali terhadap 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak ditandai oleh ekor lurus. Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam, dan data yang nyata berbeda dilanjutkan dengan uji Duncan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Semen babi yang telah ditampung dengan metode *massage* dilakukan pemeriksaan secara makroskopis dan mikroskopis untuk

mengetahui kualitasnya. Hasil evaluasi semen babi disajikan pada Tabel 1.

Hasil pemeriksaan kualitas semen segar yang disajikan pada Tabel 1, menunjukkan semen mempunyai kualitas baik dan semen layak untuk diproses ke tahap pengenceran. Semen diencerkan sesuai dengan perlakuan dan disimpan pada suhu 15°C selama 72 jam.

Hasil pemeriksaan kualitas semen setelah diberi perlakuan dan disimpan selama 72 jam pada suhu 15°C disajikan pada Table 2.

Setelah dilakukan analisis degansidik ragam, penambahan berbagai konsentrasi BSA menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) terhadap motilitas progresif, daya hidup, abnormalitas, dan membran plasma utuh spermatozoa babi *landrace*. Setelah dilanjutkan dengan uji Duncan, penambahan BSA dengan konsentrasi 10 mg/mL dan 15 mg/mL pengencer, memberikan pengaruh yang sama baiknya terhadap motilitas progresif spermatozoa, persentase spermatozoa yang mati, abnormalitas, dan membran plasma utuh dan lebih baik ($P < 0,05$) jika dibandingkan konsentrasi 0 mg/mL, 5 mg/mL, dan 20 mg/mL.

Hasil penelitian menunjukkan penambahan konsentrasi BSA 10 mg/mL dan 15 mg/mL pengencer BTS memberikan hasil sama baiknya ($p > 0,05$) terhadap kualitas semen babi yang disimpan pada suhu 15°C selama 72 jam, jauh lebih baik jika dibandingkan dengan kontrol ($p < 0,05$), konsentrasi 5 mg/mL, dan konsentrasi 20 mg/mL ($p < 0,05$). Penambahan BSA pada pengencer BTS berperan untuk mensubstitusi protein semen saat pengenceran, mampu mencegah *coldshock*, dan juga berperan sebagai antioksidan.

Semen babi mempunyai keistimewaan karena diproduksi dalam volume yang besar dan sangat sensitif terhadap *coldshock*, daya hidup sel spermatozoa secara dramatis berkurang bila terpapar suhu di bawah 15°C (Gilmore *et al.*, 1996). Oleh karena itu dalam memanipulasi semen babi memerlukan pertimbangan khusus selama proses penyimpanan, seperti jenis bahan dasar yang digunakan untuk pembuatan pengencer, konsentrasinya, dan suhu penyimpanan (Johnson dan Waitze, 2000).

Menurut Holt (2000) dan Watson (2000) ada banyak faktor yang menyebabkan rendahnya daya fertilitas semen babi seperti : membran plasma spermatozoa babi sangat sensitif terhadap *coldshock* akibat perubahan temperatur selama proses penyimpanan pada

Tabel 1. Kualitas semen segar babi *landrace*

Kualitas semen		
Pemeriksaan Makroskopis	Kekentalan Semen	
	Warna Semen	Putih krem
	Volume Semen (mL)	175 ml
	Keasaman /pH	7
	Bau	Khas semen babi
Pemeriksaan Mikroskopis	Gerakan massa	+++
	Konsentrasi (10 ⁶ /mL)	795
	Pergerakan Progresif (%)	86 P
	Spermatozoa Hidup (%)	89
	Abnormalitas Spermatozoa (%)	5,0

Keterangan: +++ = Gerakan gelombang massa baik.

P = Gerakan individu sperma maju dan cepat.

Tabel 2. Kualitas semen babi *landrace* setelah penambahan berbagai konsentrasi bovine serum albumin (BSA) yang disimpan pada suhu 15°C selama 72 jam

Konsentrasi BSA	Pengamatan			
	Motilitas (%)	Spermatozoa Mati (%)	Abnormalitas (%)	Membran Plasma Utuh
0 mg/mL pengencer	39,00 ± 2,00 ^a	10,80 ± 1,92 ^a	13,20 ± 1,30 ^a	43,40 ± 1,14 ^a
5 mg/mL pengencer	41,60 ± 0,54 ^b	7,60 ± 1,14 ^b	11,40 ± 1,14 ^b	46,40 ± 1,14 ^b
10 mg/mL pengencer	46,80 ± 0,83 ^c	5,80 ± 0,84 ^c	6,80 ± 0,84 ^c	53,40 ± 1,81 ^c
15 mg/mL pengencer	47,40 ± 1,51 ^c	5,60 ± 0,55 ^c	6,80 ± 1,64 ^c	53,40 ± 2,40 ^c
20 mg/mL pengencer	17,40 ± 2,07 ^d	14,40 ± 0,55 ^d	15,60 ± 0,55 ^d	26,20 ± 3,11 ^d

suhu dingin. Selama proses penyimpanan dingin, PUFA menurun secara dramatis akibat terjadi proses peroksidasi lipid, dan adanya ROS yang memengaruhi spermatozoa (Sikka, 2001). Sumber utama pembentukan ROS adalah spermatozoa yang abnormal, mati dan yang mengalami kerusakan (Silva *et al.*, 2012). Pembentukan ROS yang berlebihan dapat memengaruhi motilitas spermatozoa, kerusakan pada *mid-piece* dan fusi fusi denan sel telur. Adanya ROS dapat membuat spermatozoa mengalami abnormalitas dan kematian (Chatterjee *et al.*, 2001; Agarwal dan Said, 2005).

Penambahan senyawa antioksidan kedalam pengencer dapat meminimalkan pembentukan ROS dan melindungi fungsi membran plasma (Peña *et al.*, 2003; Gadea *et al.*, 2004; Maldjian *et al.*, 2005). Bebas *et al.* (2015) melaporkan penambahan vitamin C pada pengencer untuk mempertahankan kualitas semen babi selama penyimpanan dan juga penambahan Vit E pada pengencer BTS mampu mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa babi

landrace selama penyimpanan (Bebas *et al.*, 2016). Bebas dan Gorda (2016) juga melaporkan bahwa penambahan *astaxanthin* sebagai antioksidan pada pengencer semen babi mampu mempertahankan kualitas semen selama penyimpanan.

Hasil penelitian ini sejalan dengan laporan Azawi dan Husein (2011), bahwa penambahan BSA 10 mg/mL pengencer pada semen domba berdampak baik terhadap kualitas semen selama penyimpanan. Namun, sebaliknya peningkatan konsentrasi menjadi 20 mg/mL pengencer berdampak buruk terhadap kualitas semen karena terjadi peningkatan tekanan osmosis pada pengencer.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi BSA yang paling optimal pada pengencer BTS untuk penyimpanan semen babi pada suhu 15°C selama 72 jam adalah 10 mg/mL pengencer.

SARAN

Perlu dilakukan uji terhadap daya fertilitas dan banyak anak sekelahiran (*litter size*) dari kualitas semen dengan melakukan inseminasi buatan pada babi betina birahi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari Hibah Unggulan Program Studi Skim HUPS dengan Surat Perjanjian Kerja (SPK) No : 0783/UN14.2.9/LT/2018. Penulis berterima kasih kepada LPPM Universitas Udayana yang telah memfasilitasi pelaksanaan proyek hibah ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal A, Said TM. 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Intl* 95: 503-507.
- Azawi OI, Hussein EK (2011). Study on the effect of adding bovine serum albumin to semen diluent on introduction the viability of wassi Ram semen preserved at 5°C. *Advanced Veterinary Research* 1: 115-118
- Baks MR, Cecil HC. 1992. Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 287-293.
- Bebas W, Budiasa MK, Astutik IY. 2015. Penambahan vitamin C pada pengencer spermatozoa babi landrace yang disimpan pada suhu 15°C. *Buletin Veteriner Udayana* 7(2): 179-185
- Bebas W, Buyona GL, Budiasa MK. 2016. Penambahan vitamin E pada pengencer *BTS*[®] terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi landrace pada penyimpanan 15°C. *Buletin Veteriner Udayana* 8(1): 1-7.
- Bebas W, Gorda W. 2016. Penambahan astaxanthin pada pengencer kuning telur berbagai jenis unggas dapat memproteksi semen babi selama penyimpanan. *Jurnal Veteriner* 17(4): 484-491.
- Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT. 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 63: 2126-2135.
- Chatterjee S, De Lamirande E, Gagnon C. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev* 60: 498-506
- Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan, Direktorat Budi Daya Ternak (2012). *Pedoman penataan usaha ternak babi ramah lingkungan*. Direktorat Budi Daya Ternak. Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan (2015). *Populasi Babi Menurut Provinsi*.
- Gadea J. 2003. Pig industry-semen extenders used in the artificial insemination of swine. A Review. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 1(2): 12-17.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation, effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extender. *Theriogenology* 62: 690-701.
- Gilmore JA, Junying D, Jun T, Peter AT, Crister JK. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J Reprod Fertil* 107: 87-95
- Hafez ESE, Hafez B. (2000). *Transport and survival of gametes in reproduction in farm animal*. 7th. Ed. Hafez ESE, Hafez B. Kiawah Island, South Carolina, USA.
- Holt WV, 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
- Hu J-H, Qing Li W, Li G, Chen XY, Yang H, Zhang SS, Wang LQ. 2006. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. *Asian-Aust J Anim Sci* 19(4): 486-494
- Johnson LA, Weitze KF. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci* 62: 143-172.
- Kvist U, Bjōrndahl L. 2002. Editorial. In: Kvist U, Bjōrndahl L, Eds. *Manual on Basic Semen Analysis*. ESHRE Monographs. Oxford, United Kingdom. Oxford University Press.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi B, Macis D. 2004. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *J Dom Anim* 38(5): 410-414.
- Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi T, Cerolini S, Penny P, Noble R. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63: 411-421.

- Sikka SC. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function, A Review. *Current Med Chem*8(7): 851-862.
- Silva SV, Soares AT, Batista A, Almeida F, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP. 2012. Vitamin E (trolox) addition to tri-egg yolk extender preserves ram spermatozoon structure and kinematics after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* (Impact Factor: 1.56). 12/2012; DOI:10.1016/j.anireprosci.2012.12.002. Source: PubMed
- Tanaka AS, Kuwabara Y, Takagi K, Nakagawa Y, Fujimoto M, Tsutsu MT. 2000. Effect of ejaculation intervals on semen quality in cat. *J Vet Med Sci*62(11): 1157-1164.
- Thompson LH. 2005. *Managing Swine Reproduction*. Urbana. Illinois. University of Illinois.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Bandung. Angkasa
- Wagner HG, Thibier M. 2000. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. *Proc 14th ICAR*. Stockholm Sweden. 2(15): 3
- Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*60-61: 481-492
- Zamfirescu S, Ciupina Victor C, Nadolu-Dorin N. 2001. Utilizarea testului hipoosmotic entru evaluarea integritatii functionale a membrane spermatozoizilor de berbec dupa congelare-decongelare. *Bul SNBC* 29: 248