

## VIABILITAS SPERMATOZOA KERBAU KALIMANTAN SELATAN YANG DIPRESERVASI DENGAN PENGECER NIRA AREN DAN BEBERAPA KONSENTRASI GLISEROL

Muhammad Rizal<sup>1\*</sup>, Muhammad Riyadhi<sup>1</sup>, Muhammad Thahir<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat  
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan 70714

<sup>2</sup>Dinas Pertanian Kabupaten Enrekang, Jl. Poros Pinang–Rappang Km. 3 Enrekang 91712

\*Corresponding author: mrizal@ulm.ac.id

**Abstract.** The objective of this study was to examine the effect of various glycerol concentrations in sugar palm juice extender on viability of Kalimantan Selatan buffalo spermatozoa preserved at 5°C. Semen was collected by artificial vagina. Fresh semen was immediately evaluated and divided into four tubes, then diluted with: 73% lactose-based extender + 20% egg yolk + 7% glycerol (LG-7) as control, 74% sugar palm juice + 20% egg yolk + 6% glycerol (SPJG-6), 73% sugar palm juice + 20% egg yolk + 7% glycerol (SPJG-7), and 72% sugar palm juice + 20% egg yolk + 8% glycerol (SPJG-8), respectively. Diluted-semen was preserved in refrigerator at 5°C. Spermatozoa viability including percentages of motile spermatozoa and live spermatozoa were evaluated every day for three days. The results of this study showed that there were no differences between treatments on viability of Kalimantan Selatan buffalo spermatozoa until day-4 of preservation. On the third day of preservation, percentages of motile and live spermatozoa were 46.25 and 58.25% for LG-7, 43.75 and 58.25% for SPJG-6, 45.00 and 52.50% for SPJG-7, 41.25 and 52.00% for SPJG-8. All treatments were qualify for used in the artificial insemination program. It can be concluded that lactose and sugar palm juice extenders containing 6–8% glycerol have the equal ability to maintain viability of Kalimantan Selatan buffalo spermatozoa during preservation at 5°C.

**Keywords:** sugar palm juice, glycerol, preservation, spermatozoa, swamp buffalo

### 1. PENDAHULUAN

Kerbau rawa (*Bubalus bubalis*) yang ada di Provinsi Kalimantan Selatan melalui SK Mentan tahun 2012 telah ditetapkan sebagai salah satu rumpun tersendiri dan diberi nama kerbau Kalimantan Selatan. Di dalam SK tersebut juga ditegaskan bahwa kerbau Kalimantan Selatan merupakan kekayaan sumber daya genetik ternak lokal Indonesia yang harus dilindungi dan dilestarikan. Salah satu bentuk yang efektif untuk melestarikan kerbau Kalimantan Selatan tersebut adalah dengan memperbanyak populasi, sehingga dapat meningkatkan kesejahteraan masyarakat peternak kerbau.

Penerapan teknologi inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu metode alternatif untuk mempercepat peningkatan populasi dan memperbaiki kualitas genetik kerbau (Morrell, 2006). Pengeceran dan penyimpanan (preservasi) semen merupakan bagian integral tak terpisahkan dengan teknologi IB (Sansone *et al.*, 2000). Menurut Toelihere (1993) tujuan utama pengolahan semen adalah meningkatkan kapasitas semen untuk melayani lebih banyak ternak betina. Untuk mencapai tujuan ini, semen diencerkan dengan bahan-bahan pengencer tertentu, yang memenuhi syarat seperti: sumber energi, penyangga, tidak toksik, mencegah kerusakan

pada spermatozoa, tidak mereduksi fertilitas spermatozoa, tidak menghalangi proses evaluasi spermatozoa setelah pengeceran, murah, dan mudah diperoleh.

Nira aren dapat menjadi alternatif pengencer semen karena mengandung sejumlah nutrisi yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama preservasi (Rizal & Riyadhi, 2016). Preservasi semen pada suhu rendah dibutuhkan senyawa khusus berupa krioprotektan yang berfungsi melindungi spermatozoa dari kerusakan (Andrabi *et al.*, 2009). Gliserol merupakan senyawa krioprotektan yang umum digunakan dalam preservasi semen berbagai jenis ternak (Supriatna & Pasaribu, 1992). Kombinasi antara kuning telur dan gliserol umum digunakan dalam proses preservasi semen kerbau. Protein dan lesitin kuning telur berfungsi menjaga keutuhan lipoprotein yang ada pada membran plasma sel spermatozoa selama preservasi pada suhu rendah (Kumar *et al.*, 1992). Penelitian ini bertujuan menguji pengaruh beberapa konsentrasi gliserol di dalam pengencer nira aren terhadap viabilitas spermatozoa kerbau Kalimantan Selatan yang dipreservasi pada suhu sekitar 5°C.

## 2. METODE

### 2.1 Koleksi, Evaluasi, dan Preservasi Semen

Semen dikoleksi dari satu ekor kerbau rawa dewasa menggunakan vagina buatan. Selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap kualitas semen segar yang meliputi: volume, konsistensi (kekentalan), derajat keasaman (pH), gerakan massa, konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa abnormal. Semen segar yang memenuhi syarat kualitas kemudian diencerkan sesuai dengan perlakuan. Semen segar yang baik harus memiliki persentase spermatozoa motil > 60% (Akhter *et al.*, 2011; Barati *et al.*, 2009; Wadood *et al.*, 2016), gerakan massa  $\geq ++$  (Evans dan Maxwell, 1987), dan persentase spermatozoa abnormal 6–10% (Delgadillo, 1992; Ax *et al.*, 2000).

Semen yang layak dimanfaatkan untuk tujuan IB dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi dengan volume yang sama, kemudian masing-masing diencerkan dengan empat jenis pengencer berbeda sebagai perlakuan, yakni: 73% pengencer dasar laktosa + 20% kuning telur ayam ras + 7% gliserol (LG-7) sebagai kontrol, 74% nira aren + 20% kuning telur ayam ras + 6% gliserol (NAG-6), 73% nira aren + 20% kuning telur ayam ras + 7% gliserol (NAG-7), dan 72% nira aren + 20% kuning telur ayam ras + 8% gliserol (NAG-8). Proses penyiapan nira aren sebagai pengencer dilakukan dengan memanaskan nira aren yang baru disadap hingga mendidih kemudian disaring dengan kertas saring. Komposisi pengencer dasar laktosa terdiri atas 9,3 g laktosa + 1,24 g fruktosa yang dilarutkan dengan akuabidestilata hingga mencapai volume 100 ml. Seluruh pengencer tersebut ditambahkan antibiotik berupa penisilin sebanyak 1.000 µg/ml pengencer dan streptomisin sebanyak 1.000 IU per mililiter pengencer. Semen diencerkan hingga mencapai konsentrasi 15 juta spermatozoa motil per mililiter.

Tabung reaksi-tabung reaksi yang berisi semen yang telah diencerkan sesuai dengan perlakuan ditutup rapat kemudian dimasukkan ke gelas piala yang berisi air bersih dan disimpan di dalam *refrigerator* lemari es yang bersuhu sekitar 5°C. Kualitas spermatozoa yang meliputi persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup masing-masing perlakuan dievaluasi setiap hari hingga persentase spermatozoa motil mencapai 40%, berdasarkan ketentuan di dalam SNI 4869.2-2017.

### 2.2 Variabel Kualitas Spermatozoa yang Dievaluasi

Kualitas spermatozoa dievaluasi pada tahap setelah koleksi (semen segar) serta setelah pengenceran dan preservasi. Kuantitas dan kualitas semen yang dievaluasi pada tahap semen segar adalah: volume, warna, kekentalan (konsistensi), derajat keasaman (pH), gerakan massa spermatozoa, konsentrasi spermatozoa, persentase spermatozoa motil, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa abnormal. Evaluasi terhadap spermatozoa yang telah diencerkan dan dipreservasi meliputi: persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup.

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

Persentase spermatozoa hidup dievaluasi dengan pewarnaan eosin-nigrosin (Felipe-Perez *et al.*, 2008). Spermatozoa yang hidup ditandai oleh kepala berwarna putih, sedangkan yang mati ditandai oleh kepala berwarna merah. Sebanyak minimum 200 spermatozoa dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x.

### 2.3 Analisis Data

Data dianalisis dengan analisis ragam dalam bentuk rancangan acak lengkap dengan empat perlakuan dan lima kali ulangan. Perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji beda nyata terkecil (Steel dan Torrie, 1993).

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 3.1 Karakteristik Semen Segar

Hasil penelitian menunjukkan bahwa karakteristik semen segar kerbau Kalimantan Selatan adalah volume rata-rata 1,67 ml, gerakan massa rata-rata 2, konsentrasi spermatozoa rata-rata 1.226 juta sel/ml, persentase spermatozoa motil rata-rata 72,50%, persentase spermatozoa hidup rata-rata 86,25%, dan persentase spermatozoa abnormal rata-rata 4,25% (Tabel 1). Semen segar kerbau yang baik dan memenuhi syarat untuk diolah menjadi semen cair dingin atau semen beku harus memiliki persentase spermatozoa motil > 60% (Akhter *et al.*, 2011), gerakan massa spermatozoa  $\geq 2$  (Evans & Maxwell, 1987), dan persentase spermatozoa abnormal 6–10% (Delgadillo, 1992; Ax *et al.*, 2000).

Tabel 1. Rataan karakteristik semen segar kerbau Kalimantan Selatan

Unsur	Ukuran
Volume (ml)	1,67 ± 0,33
Warna	Putih keruh
Derajat keasaman (pH)	6,70 ± 0,03
Konsistensi (kekentalan)	Sedang
Gerakan massa	2
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	1.226 ± 92,12
Spermatozoa motil (%)	72,50 ± 3,45
Spermatozoa hidup (%)	86,25 ± 2,76
Spermatozoa abnormal (%)	4,25 ± 0,36

Pada penelitian sebelumnya, dilaporkan bahwa volume semen kerbau lumpur adalah rata-rata 2,02 ml (Rizal *et al.*, 1999) dan 0,225 ml (Yulnawati *et al.*, 2009), rata-rata 1,44–1,76 ml pada kerbau rawa (Sianturi *et al.*, 2012), dan rata-rata 2,9 ml pada kerbau di Iran (Mahmoud *et al.*, 2013). Kekentalan semen dan gerakan massa spermatozoa kerbau lumpur masing-masing rata-rata kental dan 2–3 (Rizal *et al.*, 1999) serta encer hingga kental dan 2–3 pada kerbau rawa (Sianturi *et al.*, 2012). Konsentrasi spermatozoa kerbau lumpur rata-rata 1.447,14 juta/ml (Rizal *et al.*, 1999), 2.695 juta sel/ml (Yulnawati *et al.*, 2010), rata-rata 1.070–1.983 juta sel/ml pada kerbau rawa (Sianturi *et al.*, 2012), dan rata-rata 1.079,2 juta sel/ml pada kerbau di Iran (Mahmoud *et al.*, 2013). Persentase spermatozoa motil pada kerbau lumpur rata-rata 76,43% (Rizal *et al.*, 1999), rata-rata 70% (Yulnawati *et al.*, 2010), dan rata-rata 65,8% pada kerbau di Iran (Mahmoud *et al.*, 2013). Rizal *et al.* (1999) melaporkan persentase spermatozoa hidup pada kerbau lumpur rata-rata 85,71% dan spermatozoa abnormal rata-rata 12,14%. Mahmoud *et al.* (2013) melaporkan persentase spermatozoa hidup pada kerbau di Iran adalah rata-rata 70,9%.

### 3.2. Kualitas Spermatozoa selama Proses Preservasi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi penurunan viabilitas spermatozoa (persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup) dengan bertambahnya waktu penyimpanan semen pada semua perlakuan. Hal ini disebabkan oleh menurunnya kualitas pengencer menjadi lebih asam. Kondisi asam terjadi karena adanya penumpukan asam laktat hasil metabolisme. Hasil akhir proses metabolisme spermatozoa yang dipreservasi di dalam refrigerator lemari es adalah asam laktat, karena

penyimpanan berlangsung secara anaerobik (tanpa oksigen). Menurut Lenhninger (1994) hasil akhir metabolisme sel dalam kondisi anaerobik adalah asam laktat. Prinsip utama preservasi semen terkait dengan upaya memperpanjang daya hidup spermatozoa adalah menurunkan derajat metabolisme melalui penyimpanan pada suhu rendah (Lemma, 2011). Preservasi semen pada suhu 5°C menyebabkan perubahan membran plasma sel spermatozoa dari bentuk cair ke bentuk gel. Metabolisme sel maksimal pada suhu tubuh, dan optimal saat penyimpanan pada suhu ruangan (24–29°C). Menurut McKinnon (1999) setiap penurunan suhu 10°C, mengakibatkan penurunan metabolisme hingga 50%, sehingga preservasi pada suhu 5°C metabolisme spermatozoa hanya terjadi sekitar 10% saja.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa tidak terdapat perbedaan antarperlakuan terhadap variabel persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup (Tabel 2) selama tiga hari preservasi pada suhu sekitar 5°C. Hal ini menunjukkan bahwa pengencer laktosa dan nira aren yang mengandung 6–8% gliserol memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa selama proses preservasi. Gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif terhadap spermatozoa selama proses preservasi pada suhu rendah jika konsentrasinya di dalam pengencer optimal (Gazali & Tambing, 2002).

Sebagai senyawa krioprotektan intraseluler, gliserol dapat masuk ke sel sehingga mampu melindungi sel spermatozoa dari kerusakan selama preservasi pada suhu rendah. Gliserol juga dapat dimetabolisir oleh spermatozoa menjadi sumber energi (Ihsan, 2013), sehingga dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama preservasi. Penggunaan gliserol sebanyak 7% di dalam pengencer tris kuning telur mampu mencegah terjadinya kejutan dingin (*cold shock*), sehingga berpengaruh positif terhadap daya hidup spermatozoa. Konsentrasi gliserol yang berlebihan di dalam pengencer, akan berakibat buruk terhadap spermatozoa, karena akibat metabolisme gliserol menyebabkan terjadi penimbunan asam laktat (Mumu, 2009). Efek toksisitas gliserol adalah memodifikasi struktur membran plasma sel spermatozoa, dan pada konsentrasi yang tinggi dapat menghambat proses metabolisme (Tambing *et al.*, 2000).

Tabel 2. Rataan persentase spermatozoa motil dan spermatozoa hidup selama preservasi

Variabel	Perlakuan	Penyimpanan hari ke-			
		1	2	3	4
Spermatozoa motil (%)	LG-7	72,50 ± 3,45	56,25 ± 2,34	46,25 ± 1,89	32,50 ± 1,79
	NAG-6	72,50 ± 3,45	52,50 ± 3,46	43,75 ± 1,98	31,25 ± 2,01
	NAG-7	72,50 ± 3,45	55,00 ± 2,57	45,00 ± 2,01	31,25 ± 1,93
	NAG-8	72,50 ± 3,45	55,00 ± 2,72	41,25 ± 1,88	32,50 ± 2,23
Spermatozoa hidup (%)	LG-7	86,25 ± 2,76	71,25 ± 2,54	58,25 ± 2,46	46,00 ± 2,76
	NAG-6	86,25 ± 2,76	70,50 ± 1,99	58,25 ± 2,15	44,50 ± 2,59
	NAG-7	86,25 ± 2,76	70,75 ± 2,41	52,50 ± 3,09	46,00 ± 2,74
	NAG-8	86,25 ± 2,76	68,25 ± 2,36	52,00 ± 2,79	46,25 ± 2,69

LG-7 = pengencer 73% laktosa + 20% kuning telur ayam + 7% gliserol  
NAG-6 = pengencer 74% laktosa + 20% kuning telur ayam + 6% gliserol  
NAG-7 = pengencer 73% laktosa + 20% kuning telur ayam + 7% gliserol  
NAG-8 = pengencer 72% laktosa + 20% kuning telur ayam + 8% gliserol.

Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan bahwa konsentrasi gliserol sebanyak 6–8% tidak menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa kerbau Kalimantan Selatan yang drastis selama preservasi. Hasil beberapa penelitian dilaporkan bahwa konsentrasi gliserol sebanyak 6–7% umum digunakan dalam preservasi semen kerbau (Abbas & Andrabi, 2002; Mughal *et al.*, 2017; Mostafa *et al.*, 2019) dan spermatozoa epididimis kerbau (Barati *et al.*, 2009). Pada jenis ternak lain, dilaporkan bahwa konsentrasi gliserol sebanyak 5, 6, dan 7% mampu mempertahankan persentase spermatozoa motil sapi Brahman (Sari *et al.*, 2014) dan spermatozoa kambing Peranakan Etawah (Tambing *et al.*, 2000) selama pada fase pendinginan semen.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semen kerbau Kalimantan Selatan yang diencerkan dengan pengencer laktosa dan nira aren dengan konsentrasi gliserol sebanyak 6–8% dapat dipreservasi selama dua hari pada suhu sekitar 5°C untuk keperluan aplikasi IB, karena masih memiliki persentase spermatozoa motil > 40%. Berdasarkan SNI 4869.2-2017 ditetapkan bahwa semen yang memenuhi syarat digunakan dalam program IB harus memiliki persentase spermatozoa motil minimum 40%.

#### 4. SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa semen segar yang dihasilkan oleh kerbau percobaan memiliki kuantitas dan kualitas yang baik dan memenuhi syarat untuk diolah menjadi semen cair dingin atau semen beku untuk keperluan IB. Pengencer laktosa dan nira aren yang mengandung 6–8% gliserol memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan viabilitas spermatozoa kerbau Kalimantan Selatan selama preservasi pada suhu sekitar 5°C. Pengencer laktosa dan nira aren yang mengandung 6–8% gliserol dapat dipreservasi selama dua hari pada suhu sekitar 5°C, dan memenuhi syarat digunakan dalam aplikasi IB.

#### 5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan dan Staf Balai Inseminasi Buatan (BIB) Provinsi Kalimantan Selatan dan Pengelola Laboratorium Produksi Ternak Jurusan Peternakan ULM atas kerja sama dan bantuannya sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik.

#### 6. DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. & S.M.H. Andrabi. 2002. Effect of different glycerol concentrations on motility before and after freezing, recovery rate, longevity and plasma membrane integrity of Nili-Ravi buffalo bull spermatozoa. *Pakistan Vet. J.* 22:1-4.
- Akhter, S., B.A. Rakha, M.S. Ansari, S.M.H. Andrabi, & N. Ullah. 2011. Storage of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in skim milk extender supplemented with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol. *Pakistan J. Zool.* 43:273-277.
- Andrabi, S.M.H., M.S. Ansari, N. Ullah, M. Anwar, A. Mehmood, & S. Akhter. 2008. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 104:427-433.
- Ax, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, & M.E. Bellin. 2000. Semen evaluation. In: Hafez B, Hafez ESE. *Reproduction in Farm Animals* 7th Ed. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Barati, F., K.M. Khaksary Mahabady, & Gh. Mohammadi. 2009. Cryopreservation of *in situ* cool stored buffalo (*Bubalus bubalis*) epididymal sperm. *Iranian J. Vet. Res.* 10:339-345.
- Delgadillo, J.J., B. Leboeuf, & P. Chemineau. 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by

- photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rum. Res.* 9:47-59.
- Evans, G. & W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artificial of Sheep Goats*. London: Butterworths.
- Felipe-Perez, Y.E., M.L. Juarez-Mosqueda, E.O. Hernandez-Gonzalez, & J.J. Valencia. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Vet. Bras.* 2:123-130.
- Gazali, M. & S.N. Tambing. 2002. Kriopreservasi sel spermatozoa. *Hayati* 9:27-32.
- Ihsan, M.N. 2013. Pembekuan vitrifikasi semen kambing Boer dengan tingkat gliserol berbeda. *J. Ternak Tropika* 14:38-45.
- Kumar, S., K.L. Sahni, & G. Mohan. 1992. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.* 2:151-156.
- Lehninger, A.L. 1994. *Dasar-dasar Biokimia* Jilid 2. Alih bahasa: M. Thenawijaya. Jakarta: Erlangga.
- Lemma, A. 2011. Effect of cryopreservation on sperma quality and fertility. In: M. Manafi (editor). 2011. *Artificial Insemination in Farm Animals*. Diakses dari <https://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/effect-of-cryopreservation-on-sperm-quality-and-fertility>
- Mahmoud, K.G.M., A.A.E. El-Sokary, M.E.A. Abou El-Roos, A.D. Abdel Ghaffar, & M. Nawito. 2013. Sperm characteristics in cryopreserved buffalo bull semen and field fertility. *Iranian J. Appl. Anim. Sci.* 3:777-783.
- McKinnon, A.O. 1999. Breeding and its technology - now and the future. Diakses dari [www.harness.org.au/99wldcon/CONFEREN.HTM](http://www.harness.org.au/99wldcon/CONFEREN.HTM)
- Morrell, J.M. 2006. Update on semen technologies for animal breeding. *Reprod. Domest. Anim.* 41:63-67.
- Mostafa, A.A., M.S. El-Beley, S.T. Ismail, R.I. El-Sheshtawy, & M.I. Shahba. 2019. Effect of butylated hydroxytoluene on quality of pre-frozen and frozen buffalo semen. *Asian Pacific J. Reprod.* 8:20-24.
- Mughal, D.H., A. Ijaz, M.S. Yousaf, F. Wadood, & U. Farooq. 2017. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen-limitations and protections. *Buffalo Bulletin* 36:1-14.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas semen sapi simental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *J. Agroland* 16:172-179.
- Rasul, Z., N. Ahmad, & M. Anzar. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J. Androl.* 22:278-283.
- Rizal, M., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, & P. Situmorang. 1999. Pengaruh plasma semen sapi terhadap kualitas semen beku kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*). *J. Ilmu Ternak dan Veteriner* 4:143-147.
- Rizal, M. & M. Riyadhi. 2016. Fertilitas semen kerbau rawa (*Bubalus bubalis carabanensis*) yang diencerkan dengan pengencer nira aren. *J. Veteriner* 17:457-467.
- Sansone, G., M.J.F. Nastro, & A. Fabbrocini. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:55-76.
- Sari, D.O., Tjandrakirana, & N. Ducha. 2014. Pengaruh berbagai konsentrasi gliserol dalam pengencer Cep-D terhadap motilitas spermatozoa sapi Brahman yang disimpan dalam nitrogen cair. *LenteraBio* 3:222-225.
- Sianturi, R.G., B. Purwantara, I. Supriatna, Amrozi, & P. Situmorang. 2012. Optimasi inseminasi buatan pada kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) melalui teknik sinkronisasi estrus dan ovulasi. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner* 17:169-178.
- Standar Nasional Indonesia. 2017. *SNI 4869.2-2017 Semen Beku – Bagian 2: Kerbau*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Supriatna, I. & F.H. Pasaribu. 1992. *In Vitro Fertilisasi, Transfer Embrio dan Pembekuan Embrio*. Bogor: Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor.
- Tambing, S.N., M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, & I.K. Utama. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner* 5:1-8.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung: Angkasa.
- Wadood, F., M. Aleem, A. Ijaz, M. Ahmad, M.S. Yousaf, & H. Mughal. 2016. Effect of extender osmolality and butylated hydroxy toluene supplementation on post thaw quality and fertility of Nili Ravi buffalo bull (*Bubalus bubalis*) semen. *The J. Anim. Plant Sci.* 26:605-611.

- Yulnawati, M. Gunawan, Herdis, H. Maheshwari, & M. Rizal. 2009. Peranan gula sebagai krioprotektan ekstraseluler dalam mempertahankan kualitas semen beku kerbau lumpur. Prosiding Seminar Nasional Potensi dan Pengembangan Peternakan Maluku dalam Mendukung Ketahanan Pangan Nasional. Ambon, 2 Maret 2009. Hlm 236-250.
- Yulnawati, M. Gunawan, H. Maheshwari, M. Rizal, Herdis, & A. Boediono. 2010. Quality of ejaculated and epididymal sperms spotted buffalo in dextrose supplemented extender. *Hayati* 17:27-30.