

Original Article

Penambahan PGF 2α dalam pengencer semen dapat meningkatkan motilitas pasca *thawing motility* spermatozoa domba Waringin

Husnurrizal *, Ade Syahriani Arintonang, Tongku Nizwan Siregar, Teuku Armansyah, Hafizuddin

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, 23111

*Correspondence: husnurrizal@unsyiah.ac.id

Received: March 12th, 2021; Accepted: July 25th, 2021; Published online: July 30th, 2021

Abstrak

Tujuan: Tujuan penelitian ini adalah meningkatkan motilitas spermatozoa domba Waringin melalui penambahan PGF 2α dalam pengencer semen.

Metode: Sebanyak 3 ekor domba Waringin berumur 2-3 tahun digunakan dalam penelitian ini. Sampel semen dikoleksi menggunakan vagina buatan. Evaluasi kualitas spermatozoa dilakukan segera setelah koleksi secara makroskopis dan mikroskopis. Setelah sampel semen dikoleksi dan dievaluasi, kemudian ditambahkan pengencer Andromed. Sampel semen kemudian dibagi atas tiga grup dengan penambahan masing-masing, yakni: K1 (NaCl fisiologis), K2 (37,50 μ g PGF 2α), dan K3 (75,00 μ g PGF 2α). Setelah sampel disimpan dalam diekuilibrasikan selama empat jam selanjutnya dilakukan pemeriksaan motilitas spermatozoa pasca ekuilibrasikan, sedangkan pemeriksaan *post thawing motility* dilakukan setelah semen mengalami proses pembekuan (*freezing*) dan setelah semen beku disimpan selama 24 jam. Seluruh data hasil penelitian dianalisis menggunakan analisis varian satu arah (ANOVA) dan uji lanjutan dengan uji berganda Duncan.

Hasil: Persentase motilitas pasca ekuilibrasikan spermatozoa domba Waringin pada K1; K2; dan K3 masing-masing adalah $43,67 \pm 1,20$; $75,00 \pm 4,00$; dan $82,33 \pm 3,18$ ($P < 0,05$) dan persentase motilitas pasca *thawing* spermatozoa domba Waringin pada K1; K2; dan K3 masing-masing adalah $25,33 \pm 1,85$; $49,33 \pm 3,17$; dan $54,00 \pm 5,50$ ($P < 0,05$).

Kesimpulan: Disimpulkan bahwa terjadi peningkatan motilitas pasca ekuilibrasikan dan pasca *thawing* spermatozoa domba Waringin pada perlakuan dengan penambahan PGF 2α pada pengencer Andromed.

Kata Kunci: domba Waringin; PGF 2α ; motilitas spermatozoa; pasca ekuilibrasikan; pasca *thawing*

Abstract

Objective: The purpose of this research was to find out the rise of spermatozoa motility of Waringin sheep which was given additional amount of PGF 2α in commercial semen diluents (Andromed).

Methods: A total of 3 Waringin sheep aged 2-3 years were used in this study. Semen samples were collected using an artificial vagina and evaluation of the quality of the spermatozoa was carried out macroscopically and microscopically. This study used a unidirectional completely randomized design. After evaluated, semen samples were added with Andromed diluents afterwards divided into three groups treatment, K1; K2; and K3 where each group was then added with physiologic

NaCl, 37,5 µg PGF2α, and 75 µg PGF2α. All of the samples were equilibrated in refrigerator for 4 hours and spermatozoa motility was examined, then after the freezing process was carried out and stored for 24 hours, the post thawing spermatozoa motility was examined. The data obtained was analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and followed by Duncan test.

Results: The result of the research showed that motility of post equilibration spermatozoa (%) of Waringin sheeps at K1; K2; and K3 were 43,67 ± 1,20; 75,00 ± 4,00; and 82,33 ± 3,18 (P<0,05); and motility of post thawing spermatozoa (%) of Waringin sheeps at K1; K2; and K3 were 25,33 ± 1,85; 49,33 ± 3,17; dan 54,00 ± 5,50 (P<0,05).

Conclusions: In conclusion that was the rise in motility of prefreezing spermatozoa and motility of post thawing spermatozoa of Waringin sheep which given additional amount of PGF2α on Andromed diluents.

Keywords: Waringin sheep; PGF2α; spermatozoa motility; prefreezing; post thawing

PENDAHULUAN

Daging domba merupakan sumber protein hewani yang memiliki potensi dikembangkan di Indonesia karena rasanya yang khas dan nikmat [1]. Domba di Indonesia terdiri atas beberapa *breed*, di antaranya adalah domba Waringin. Domba Waringin yang merupakan hasil persilangan dari empat jenis memiliki sifat berkembangbiak dengan cepat, prolific karena mampu menghasilkan 2 sampai 4 anak setiap kelahirannya [2]. Domba Waringin berasal dari persilangan (*crossing*) domba lokal dengan domba introduksi yang mempunyai garis keturunan domba *Barbados blackbelly* (asal Karabia), *domba St. Croix* (asal Kepulauan Virgin, Amerika Serikat) dan domba *Suffolk* (asal Inggris) [3].

Usaha peningkatan kinerja ternak ruminansia kecil telah dilakukan dalam berbagai cara, antara lain penyediaan bibit unggul, pakan yang berkualitas dan penerapan teknologi mutakhir seperti inseminasi buatan (IB). Teknologi IB dilakukan dengan cara mendeposisikan semen cair atau semen beku pada saluran reproduksi betina. Deposisi semen ini dapat dilakukan secara *intraovagina*, *intracervix* ataupun *intrauterine* [4]. Melalui metode IB diharapkan dapat dimanfaatkan seekor pejantan untuk mengawini banyak betina dan perkawinan betina dengan pejantan yang berasal dari tempat yang berbeda kondisi lingkungannya [5].

Beberapa faktor memengaruhi keberhasilan antara lain kualitas semen, efisiensi reproduksi ternak betina,

keterampilan inseminator dan deteksi birahi dari peternak. Pelaksanaan program IB umumnya dilakukan dengan menggunakan semen beku. Namun ada beberapa permasalahan yang dihadapi dalam penggunaan semen beku antara lain, sekitar 30% spermatozoa mengalami kematian selama proses pembekuan. Fertilitas spermatozoa yang bertahan hidup setelah proses pembekuan relatif rendah. Sebagai alternatifnya, penggunaan semen cair bisa dilakukan sebagai pengganti dari semen beku [6]. Menurut Inounu [4] keberhasilan IB dengan semen beku juga dipengaruhi oleh intensitas *straw* terpapar oleh suhu ruangan dan pada saat proses pencairan semen beku (*thawing*) sebelum dilakukan IB.

Usaha dalam meningkatkan kualitas spermatozoa pada domba telah dilaporkan oleh Azawi dan Hussein [7], yaitu dengan penambahan α-tokoferol dan antibiotik dalam pengencer pada domba dapat meningkatkan kualitas spermatozoa. Namun belum ada penelitian mengenai kualitas spermatozoa pada domba Waringin. Alternatif lain dalam meningkatkan kualitas spermatozoa adalah penambahan PGF2α. Menurut Sen dan Akcay [8] pemberian PGF2α secara *in vitro* dapat meningkatkan motilitas spermatozoa disebabkan efek PGF2α pada elemen kontraktil spermatozoa. Kowalczyk *et al.* [9] menjelaskan bahwa prostaglandin hadir dalam semen yang diejakulasikan beraksi melalui reseptor prostaglandin E2 EP1 (PTGER1) dan prostaglandin E2 EP3 (PTGER3) yang memodulasi motilitas sperma, kapasitas spermatozoa, reaksi akrosom, dan peningkatan kemampuan

fertilisasi spermatozoa dengan memediasi peningkatan konsentrasi kalsium intraseluler. Menurut Aslam *et al.* [10] reseptor PTGER3 juga diekspresikan pada sapi jantan yang fertilitasnya rendah. Beberapa penelitian penambahan PGF2 α secara *in vitro* dalam pengencer dengan tujuan meningkatkan kualitas spermatozoa yang telah dilakukan antara lain pada sapi [11], babi hutan [12], dan kambing [13].

MATERI DAN METODE

Lokasi Penelitian

Pelaksanaan seleksi sampel domba jantan, dan koleksi spermatozoa domba dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Hewan Coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh, sedangkan pembuatan serta pengolahan bahan pengenceran semen, perlakuan penambahan PGF2 α pada pengencer semen, evaluasi kualitas spermatozoa, pengenceran semen, equilibrasi, proses *filling* dan *sealing* semen, evaluasi *pre freezing motility*, pembekuan semen dan pemeriksaan *post thawing motility* dilakukan di Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh.

Desain Eksperimen

Dalam penelitian ini digunakan tiga domba Waringin yang berumur 2-3 tahun. Penelitian dirancang dengan rancangan acak lengkap (RAL) pola searah. Perlakuan dibagi atas tiga grup dengan penambahan PGF2 α (Sincrovall® Mevet, MPA Veterinary Medicines and Additives Spain) dalam pengencer Andromed (Minitub) yakni masing-masing K1 (NaCl fisiologis), K2 (37,50 μ g PGF2 α), dan K3 (75,00 μ g PGF2 α).

Prosedur Penelitian

Penampungan dan Evaluasi Semen

Metode koleksi semen menggunakan vagina buatan yang dilaksanakan pada pukul 08.00 WIB sesuai dengan metode yang dianjurkan Ariyanto [14]. Selanjutnya semen dievaluasi secara makroskopis [12] dan mikroskopis [13]. Evaluasi secara makroskopis terdiri atas pemeriksaan volume, warna, pH, dan konsistensi,

sedangkan pemeriksaan mikroskopis terdiri atas konsentrasi, motilitas, viabilitas dan abnormalitas.

Pembuatan/Pengolahan Bahan Pengenceran Semen

Proses pengenceran semen yang dilakukan adalah dengan menggunakan pengencer Andromed. Pembuatan pengencer dilakukan dengan mencampurkan aquades dan Andromed dengan perbandingan 4:1 (20 ml aquades ditambahkan 5 ml Andromed), lalu dihomogenkan dan selanjutnya diletakkan dalam *waterbath* pada suhu 38 °C.

Pemberian PGF2 α

Sebelum ditambahkan PGF2 α , pengencer semen dibagi ke dalam tiga tabung (kelompok) yakni K1, 20 ml pengencer Andromed ditambahkan 0,5 ml NaCl 0,9%; K2, 20 ml pengencer Andromed ditambahkan PGF2 α sebanyak 37,5 μ g (0,5 ml); dan K3, 20 ml pengencer Andromed ditambahkan PGF2 α sebanyak 75 μ g (1 ml). Selanjutnya dilakukan pengenceran semen sesuai dengan metode yang ditetapkan [12].

Tahap Pembekuan Semen

Setelah dilakukan pengenceran, semen diekuilibrasi di dalam *refrigerator* dengan suhu ± 5 °C selama 4 jam, kemudian dilakukan proses *filling* dan *sealing* menggunakan *straw* berukuran 0,25 ml. Tahap awal pembekuan dilakukan *prefreezing*. *Prefreezing* dilakukan dengan menyusun *straw* di atas rak yang diletakkan sekitar 8 cm di atas permukaan nitrogen cair dalam *styrofoam* yang ditutup rapat selama 10 menit. Setelah proses *prefreezing* selesai, selanjutnya *straw* dicelupkan ke dalam nitrogen cair dan dimasukkan ke dalam *goblet* lalu disimpan dalam kontainer N₂. *Straw* diletakkan dalam tangki yang telah berisi N₂ (YDS-50; 50 liter) selama 24 jam.

Proses Thawing

Metode *thawing* yang dilakukan dengan memasukkan *straw* ke dalam air suhu 37 °C selama 30 detik.

Pemeriksaan Kualitas Spermatozoa Post Thawing Motility

Kualitas PTM spermatozoa diamati dengan cara meneteskan satu tetes spermatozoa di atas objek gelas, selanjutnya ditambahkan NaCl fisiologis sebanyak

satu tetes. Objek gelas kemudian ditutup dengan *cover glass*. Evaluasi motilitas spermatozoa dilakukan di bawah mikroskop (Olympus CX21LED) dengan pembesaran 40x10 mengikuti prosedur yang dilakukan Prestiya *et al.* [10]

Analisis Data

Kualitas semen yaitu motilitas pasca ekuilibrisasi dan pasca thawing kemudian dianalisis dengan analisis varian satu arah dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL

Kualitas semen segar domba Waringin ditampilkan pada Tabel 1. Rerata volume semen segar domba Waringin adalah $1,2 \pm 0,23$ ml, berwarna krem, rataan pH $6,3 \pm 0,57$ dan konsistensi kental. Kualitas tersebut menunjukkan bahwa semen yang telah diejakulasikan masuk dalam kategori normal. Secara mikroskopis, rerata konsentrasi spermatozoa domba Waringin sebesar $2.186,67 \pm 319,74$ juta/ml, rerata motilitas semen segar sebesar $66,68 \pm 5,43\%$, dan persentase viabilitas mencapai $67,39 \pm 5,99\%$, serta tingkat abnormalitas sebesar $16,07 \pm 8,60\%$.

Persentase motilitas spermatozoa pasca ekuilibrisasi domba Waringin setelah perlakuan

penambahan PGF2 α pada kelompok K1, K2, dan K3 masing-masing adalah $43,67 \pm 1,20\%$; $75,00 \pm 4,00\%$; $82,33 \pm 3,18\%$, sedangkan persentase motilitas spermatozoa pasca thawing setelah perlakuan penambahan PGF2 α pada kelompok K1, K2, dan K3 masing-masing adalah $43,67 \pm 1,20\%$; $75,00 \pm 4,00\%$; $82,33 \pm 3,18\%$. Motilitas spermatozoa domba Waringin pasca ekuilibrisasi dan pasca thawing pada K2 dan K3 meningkat dibandingkan K1 ($P < 0,05$), namun motilitas antara K2 dan K3 baik pada pasca ekuilibrisasi maupun pasca thawing menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ($P > 0,05$). Peningkatan motilitas spermatozoa domba Waringin yang lebih tinggi tampak pada penambahan PGF2 alpha dosis $75,0 \mu\text{g}$ PGF2 α (Tabel 2).

PEMBAHASAN

Rerata volume semen domba Waringin yang diperoleh adalah $1,2 \pm 0,23$ ml. Hasil ini berada dalam kisaran normal volume semen domba pada umumnya menurut Santoso dan Herdis [15] yakni $0,82 \pm 0,16$ ml dan Nalley dan Arifiantini [16] yakni $0,65 \pm 0,32$ ml. Warna, pH dan konsistensi semen yang diejakulasikan oleh domba Waringin dalam penelitian ini memiliki kualitas yang hampir sama yaitu dengan

Tabel 1. Rerata (\pm SD) kualitas semen segar domba Waringin

Pemeriksaan Kualitas	Hasil Pemeriksaan
Makroskopis:	
Volume (ml)	$1,2 \pm 0,23$
Warna	Krem
pH	$6,3 \pm 0,57$
Konsistensi	Kental
Mikroskopis:	
Konsentrasi (juta/ml)	$2186,67 \pm 319,74$
Motilitas (%)	$66,68 \pm 5,43$
Viabilitas (%)	$67,39 \pm 5,99$
Abnormalitas (%)	$16,07 \pm 8,60$

Tabel 2. Rerata (\pm SE) motilitas spermatozoa domba Waringin pada saat pasca ekuilibrisasi dan pasca thawing setelah perlakuan penambahan PGF2 alpha

Pemeriksaan Kualitas Semen	Kelompok Perlakuan		
	K1 (kontrol)	K2 ($37,5 \mu\text{g}$ PGF2 α)	K3 ($75,0 \mu\text{g}$ PGF2 α)
Motilitas pasca ekuilibrisasi (%)	$43,67 \pm 1,20^a$	$75,00 \pm 4,00^b$	$82,33 \pm 3,18^b$
Motilitas pasca thawing (%)	$25,33 \pm 1,85^a$	$49,33 \pm 3,17^b$	$54,00 \pm 5,50^b$

^{a,b}Superskripsi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

warna krem, rata-rata pH $6,3 \pm 0,57$ dan konsistensi kental. Semen yang diejakulasikan dalam penelitian ini tergolong normal [16]. pH normal semen domba yang dilaporkan oleh Herdis [17] berkisar antara 6,2-7 dan menurut Solihati *et al.* [18] berkisar antara 6,5-6,8. Konsentrasi spermatozoa domba Waringin yang diperoleh dalam penelitian ini rata-rata berkisar antara $2.186,67 \pm 319,74$ juta sperma/ml. Nilai ini sebanding dengan konsentrasi spermatozoa domba yang dilaporkan oleh Jha *et al.* [19] yaitu berkisar antara $2.644,4 \pm 555,9 - 3.628,1 \pm 654,1$ juta sperma/ml, meskipun lebih rendah dari laporan Azizunnesa *et al.* [20] yakni antara $4,8 \pm 1,8 - 5,4 \pm 1,9 \times 10^9$ sperma/ml.

Motilitas rata-rata spermatozoa segar domba Waringin yang diperoleh yaitu $66,68 \pm 5,43\%$. Jha *et al.* [19] melaporkan bahwa domba jantan memiliki $60,0 \pm 9,0 - 87,0 \pm 2,7\%$ spermatozoa motil, namun juga lebih rendah dari laporan Azizunnesa *et al.* [20]. Adapun persentase viabilitas spermatozoa domba Waringin yang diperoleh pada penelitian ini yaitu sebesar $67,39 \pm 5,99\%$. Viabilitas spermatozoa domba yang dilaporkan oleh Jha *et al.* [19] terlihat lebih tinggi yakni berkisar antara $79,7 \pm 3,6 - 94,7 \pm 1,0\%$ dan $87,3 \pm 0,2\%$. Selain itu persentase rata-rata abnormalitas yang diperoleh pada penelitian ini ($16,07 \pm 8,60$) lebih tinggi dari laporan Sujoko *et al.* [21] yakni sebesar $7,84\%$. Berdasarkan hasil evaluasi, kualitas semen segar tergolong normal [14] sehingga disimpulkan bahwa semen segar domba Waringin yang dihasilkan layak diproses lebih lanjut.

Motilitas spermatozoa domba Waringin setelah pemberian PGF2 α sesuai laporan Karahan [22], Sen dan Akçay [8], dan Prestiya *et al.* [13]. Motilitas spermatozoa setelah penambahan $125,0 \mu\text{g}$ atau $250,0 \mu\text{g}$ PGF2 α pada sapi Brown-Swiss meningkat secara signifikan meskipun telah disimpan selama 24 jam dengan suhu 4°C [22]. Penambahan PGF2 α juga mampu meningkatkan motilitas spermatozoa kuda [7] dan kambing Nubian [10].

Peningkatan motilitas spermatozoa yang terjadi ini merupakan efek positif dari penambahan PGF2 α yang bekerja

melalui inaktivasi PGF2 α pada spermatozoa. Hal ini dapat dibuktikan dengan cara menginkubasi spermatozoa dalam prostaglandin 15-*hydroxydehydrogenase* yang menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa [23]. Fungsi prostaglandin (PGs) sebagai regulator motilitas spermatozoa dimediasi oleh ATP yang terdapat dalam mitokondria (*mitochondrial sheath*) pada ekor spermatozoa [24]. Sen dan Akçay [8] menjelaskan bahwa PGs memberikan efek secara langsung terhadap pada spermatozoa dengan mengaktifkan elemen kontraktil yang mengelilingi *axonema* dan terdapat pada bagian ekor spermatozoa [25]. *Axonema* adalah struktur inti dari ekor sperma yang mengandung lengan dynein, yang berfungsi sebagai motor penggerak / motilitas spermatozoa [25].

Pemberian PGF2 α dalam pengencer semen dapat meningkatkan motilitas spermatozoa domba Waringin sesuai laporan Prestiya *et al.* [13] pada kambing Nubian. Motilitas merupakan salah satu tolak ukur terhadap daya hidup spermatozoa serta memiliki kontribusi yang penting pada saat transportasi di saluran reproduksi betina yaitu usaha untuk mencapai oosit dan penetrasi zona *pellucida*. Oleh karena itu dilakukan pengontrolan dan mempertahankan kualitas semen dengan pengenceran dan penyimpanan pada suhu rendah sebelum digunakan untuk IB. Nilai persentase *post thawing motility* untuk IB menurut SNI minimal 40% [26].

KESIMPULAN

Disimpulkan bahwa pemberian PGF2 α pada pengencer semen Andromed menyebabkan peningkatan persentase motilitas spermatozoa domba Waringin pada tahap pasca ekuilibrasi dan pasca *thawing*.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak manapun terkait materi yang ditulis dalam naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sunando, H., S. Rahayu, dan M. Baihaqi. 2016. Tingkah laku domba garut jantan muda dengan pemeliharaan intensif yang diberi ransum limbah tauge pada waktu pemberian yang berbeda. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan.* 4(1):218-226.
2. Rahayu, Y. G., T. N. Siregar, G. Gholib, C. N. Thasmi, H. Herrialfian, R. Daud, Z. Zuhrawati, H. Hamdan, dan R. Rasmaidar. 2019. Perbandingan konsentrasi progesteron selama siklus birahi pada domba waringin yang diinduksi PGF 2α dan kombinasi PGF 2α dan GnRH. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu.* 6(2):101-105. Doi: 10.23960/jipt.v6i2.p101-105
3. Alam, S. 2018. *Majalah Infovet. PT. Gallus Indonesia Utama, Jakarta Selatan.*
4. Inounu, I. 2014. Upaya meningkatkan keberhasilan inseminasi buatan pada ternak ruminansia kecil. *Wartazoa.* 24(4):201-209. Doi: 10.14334/wartazoa.v24i4.1091
5. Gibbons, A. E., J. Fernandez, M. M. Bruno-Galarraga, M. V. Spinelli, and M. I. Cueto. 2019. Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Anim. Reprod.* 16(4):803-809. Doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0129
6. Susilawati, T., F. E. Wahyudi, I. Anggraeni, N. Isnaini, dan M. N. Ihsan. 2016. Penggantian Bovine Serum Albumin pada pengencer CEP-2 dengan serum darah sapi dan putih telur terhadap kualitas semen cair sapi limousin selama pendinginan. *Jurnal Kedokteran Hewan.* 10(2):98-102. Doi: 10.21157/j.ked.hewan.v10i2.5025
7. Azawi, O. I. and E. K. Hussein. 2013. Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 C. *Vet. Res. Forum.* 4(3):157.
8. Şen, Ç. Ç. and E. Akcay. 2015. The effect of oxytocin and prostaglandin hormones added to semen on stallion sperm quality. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 39(6):705-708. Doi: 10.3906/vet-1412-69
9. Kowalczyk, A., E. Gałęska, E. Czerniawska-Piątkowska, A. Szul, and L. Hebda. 2021. The impact of regular sperm donation on bulls' seminal plasma hormonal profile and phantom response. *Sci. Rep.* 11(1):1-12. Doi: 10.1038/s41598-021-90630-8
10. Aslam, M. M., A. Kumaresan, V. K. Sharma, M. Tajmul, S. Chhillar, A. Chakravarty, A. Manimaran, T. Mohanty, A. Srinivasan, and S. Yadav. 2014. Identification of putative fertility markers in seminal plasma of crossbred bulls through differential proteomics. *Theriogenology.* 82(9):1254-1262. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.007
11. Majeed, A., A. Omar, K. Ahmed, R. Mahmood, and R. Hassan. 2017. Effect of addition of prostaglandin PGF 2α and oxytocin invitro to diluted and cooled semen of fresian bull. *Euphrates Journal of Agriculture Science. Second Veterinary Conference:* 563-568.
12. Pandur, I. D. and N. Pacala. 2012. Sperm motility after the addition of prostaglandin F 2α to the landrace boar diluted semen. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies.* 45(1):222-225.
13. Prestiya, A., T. N. Siregar, H. Husnurrizal, S. Wahyuni, E. M. Sari, H. Hafizuddin, dan B. Panjaitan. 2020. Peningkatan motilitas spermatozoa kambing Nubian setelah pemberian PGF 2α dalam pengencer andromed. *Jurnal Agripet.* 20(1):32-37. Doi: 10.17969/agripet.v20i1.15509
14. Ariyanto, K. B., L. Khotijah, D. A. Astuti, R. I. Arifiantini, and J.-B. Menassol. 2020. Semen quality of garut rams feed by different protein sources and their implementation potential in small farms of West Java. *Jurnal Agripet.* 20(1):47-55. Doi: 10.17969/agripet.v20i1.15391
15. Santoso dan Herdis. 2014. Peranan raffinosa ke dalam mempertahankan kualitas semen beku domba Garut. *Prosiding Seminar Nasional Asosiasi Reproduksi Hewan Indonesia.* 2013:110-114.
16. Nalley, W., and R. Arifiantini. 2013. The hypo-osmotic swelling test in fresh garut ram spermatozoa. *J. Indones. Trop.*

- Anim. Agric. 38(4):212-216. Doi: 10.14710/jitaa.38.4.212-216
17. Herdis, H. 2018. Karakteristik semen segar domba Garut tipe laga pada tiga waktu penampungan semen. *Zoo Indonesia*. 26(1):8-19. Doi: 0.52508/zi.v26i1.3531
 18. Solihati, N., S. Rasad, R. Setiawan, and C. Alvionita. 2018. Quality and viability of Javanese local ram semen at different age. *Proceedings of International Seminar on Livestock Production and Veterinary Technology 2016*. 5:265-270. Doi: 10.14334/Proc.Intsem.LPVT-2016-p.265-270
 19. Jha, P., M. Alam, M. Al-Mansur, M. Islam, and F. Bari. 2018. Selection of breeding rams by evaluating semen quality. *J. Appl. Anim. Res.* 11(1):9-20.
 20. Azizunnesa, B. Zohara, F. Bari, and M. Alam. 2014. Baseline study of reproductive performances of indigenous rams in Bangladesh. *J. Agric. Vet. Sci.* 7(6):83-89. Doi: 10.9790/2380-07618389
 21. Sujoko, H., M. A. Setiadi, dan A. Boediono. 2009. Seleksi spermatozoa domba Garut dengan metode sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner*. 10(3):125-132.
 22. Karahan, İ., G. Türk, and S. Gür. 2006. In vitro effects of prostaglandin F_{2α} and metamizol on motility of diluted bull semen. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 30(2006):271-278.
 23. Siregar, T. N., M. Akmal, S. Wahyuni, H. Tarigan, M. Mulyadi, dan I. Nasution. 2014. Pemberian ekstrak vesikula seminalis meningkatkan kualitas spermatozoa tetapi tidak memengaruhi konsentrasi spermatozoa dan testosteron tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Kedokteran Hewan*. 8(2):90-93. Doi: 10.21157/j.ked.hewan.v8 i2.2620
 24. Senger, P. 2012. Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions, Inc., Redmon, Oregon*.
 25. Lehti, M. S. and A. Sironen. 2017. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol. Reprod.* 97(4):522-536. Doi: 10.1093/biolre/iox096
 26. Badan Standardisasi Nasional [SNI]. 2014. SNI No. 4869.3 Semen beku-Bagian 3: Kambing dan domba. *Badan Standardisasi Nasional, Jakarta*.