

Suplementasi Level Glutathione Pada Pengencer Semen Cair Dalam Mempertahankan Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) Selama Simpan Dingin

Supplementation of Glutathione Levels in Liquid Semen Diluents in Maintaining the Quality of Ongole Crossbred (PO) Bull Semen During Cold Storage

Mohamad Ervandi^{1*}, Susan Mokoolang², dan Suci Ananda³

¹ Program Studi Manajemen Sumber Daya Hayati, Universitas Muhammadiyah Gorontalo
Jalan Prof. Dr. Mansoer Pateda, Pentadio Timur, Telaga Biru, Gorontalo 97181, Indonesia

²Program Studi Peternakan, Universitas Muhammadiyah Gorontalo

Jalan Prof. Dr. Mansoer Pateda, Pentadio Timur, Telaga Biru, Gorontalo 97181, Indonesia

³Program Studi Peternakan, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar Jalan H.M. Yasin Limpo No 36, Gowa Sulawesi Selatan 92113, Indonesia

*Korespondensi E-mail: ervandi_husain@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini bertujuan mengetahui suplementasi level glutathione pada pengencer semen cair dalam mempertahankan kualitas semen sapi peranakan ongole (PO) selama simpan dingin. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Lapang Program Studi Peternakan Fakultas Sains dan Ilmu Komputer. Metode yang digunakan yaitu eksperimental laboratory. Semen yang digunakan berasal dari 2 ekor sapi PO umur 2-3 tahun ditampung 1 minggu 2 kali. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 Perlakuan dan 10 ulang yang terdiri P0 (kontrol) = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15%. P1 = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% + Glutathione 0,75 mM. P2 = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% + Glutathione 1 mM. P3 = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% + Glutathione 1,25 mM. Data yang dihasilkan akan dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer EBM+ KT 15%+Gthn 0,75 mM memiliki kualitas lebih tinggi dengan lama simpan mencapai 6 hari dengan motilitas individu $44,21 \pm 1,19\%$ dan viabilitas $40,61 \pm 1,11\%$ dengan abnormalitas $<20\%$ setelah penyimpanan. Suplementasi level glutathione 0,75 mM pada pengencer semen cair EBM+KT 15% merupakan dosis yang optimal dalam menghasilkan motilitas, viabilitas dan abnormalitas yang baik, serta dapat digunakan dalam aplikasi IB dilapangan.

Kata Kunci: Level *Glutathione*, Semen Cair, Kualitas Semen, Sapi PO, Simpan Dingin

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the supplementation of glutathione level in liquid semen diluent in maintaining the quality of peranakan ongole (PO) bull semen during cold storage. This research was conducted at the Field

Laboratory of the Animal Husbandry Study Programme, Faculty of Science and Computer Science. The method used was experimental laboratory. Semen used came from 2 PO cows aged 2-3 years, collected 1 week 2 times. The research design used a Randomised Group Design (RAK) with 4 conditions and 10 replicates consisting of P0 (control) = red fruit extract diluent + 15% egg yolk. P1 = red fruit extract diluent + egg yolk 15% + Glutathione 0.75 mM. P2 = red fruit extract diluent + 15% egg yolk + 1 mM Glutathione. P3 = red fruit extract diluent + 15% egg yolk + 1.25 mM Glutathione. The resulting data will be analysed using Analysis of Variance. The results showed that the diluent EBM + KT 15% + Gthn 0.75 mM had a higher quality with a shelf life of up to 6 days with individual motility of $44.21 \pm 1.19\%$ and viability of $40.61 \pm 1.11\%$ with abnormalities $<20\%$ after storage. Supplementation of 0.75 mM glutathione level in 15% EBM+KT liquid semen diluent is the optimal dose in producing good motility, viability and abnormality, and can be used in AI applications in the field.

Keywords: Glutathione Levels, Liquid Semen, Semen Quality, PO Bull, Cold Storage

PENDAHULUAN

Para peternak sapi lokal di Kabupaten Gorontalo umumnya adalah peternak sapi potong yang bergerak dalam usaha perbibitan dan penggemukan secara tradisional. Para peternak di Kabupaten Gorontalo sudah menerapkan Teknologi IB untuk mempercepat dan memperbanyak keturunan secara efisien. Teknologi IB diharapkan dapat meningkatkan mutu genetik dan populasi ternak sapi lokal (Ervandi, et al., 2020 ; Ervandi, et al., 2019 ; Istiqomah, dkk., 2023). Kemampuan produksi dan potensi genetik sapi jantan dapat dinilai dari kualitas semen yang dihasilkan, sehingga harus disertai dengan teknis produksi semen yang baik karena menjadi salah satu penentu keberhasilan pelaksanaan IB di lapangan (Tethool, dkk., 2022). Namun demikian, yang terjadi saat ini pelaksanaan IB hanya tergantung pada ketersediaan semen beku disebabkan karena tidak semua daerah memiliki nitrogen cair karena ketersediaan nitrogen cair untuk media penyimpanan semen beku yang sulit didapat dan harganya sangat mahal (Ervandi, dkk., 2023). Susilawati, dkk., (2016) menyatakan bahwa penggunaan semen beku dalam program IB terdapat permasalahan yaitu kurang lebih 30% spermatozoa mati pada saat pembekuan serta fertilitas rendah. Untuk itu, penggunaan semen cair berbahan alami dapat menjadi solusi alternatif untuk bisa diaplikasikan di daerah pedesaan yang sulit akan ketersediaan nitrogen cair (Ervandi, dkk., 2023). Semen cair memiliki kelebihan yaitu tidak rumit dalam proses pembuatannya, mudah dilaksanakan pada daerah yang tidak ada nitrogen cair persentase motilitas rata-rata masih diatas 40% dan kemampuan fertilitasnya yang tinggi (Dacosta, et al., 2016). Efektivitas semen cair lebih baik dibandingkan

semen beku sehingga semen cair lebih sering digunakan (Kasminickham, et al., 2011). Berbagai bahan pengencer telah ditemukan dalam perkembangan oleh beberapa peneliti sebelumnya dengan teknik pengenceran semen cair, yang berbahan dasar alami seperti air kelapa, sari wortel, sari buah tomat, kuning telur, madu, filtrat jambu biji (Sumadiasa, et al., 2015 ; Astuti, 2018 ; Malik, dkk., 2018 ; Marawali, dkk., 2019). Namun kualitas semen yang dihasilkan rata-rata bertahan selama rentan 3-4 hari.

Berdasarkan review hasil riset sebelumnya dengan menggunakan pengencer alternatif semen cair berbahan alami kombinasi ekstrak buah merah (*Pandanus conoideus Lam*) dan air kelapa, ditemukan bahwa pengencer alternatif semen cair yang dihasilkan belum mampu untuk meningkatkan kualitas semen dalam waktu yang lebih lama serta tidak dapat melindungi membrane spermatozoa pada temperatur rendah sehingga menyebabkan kualitas dan daya fertilitas semen cair menurun seiring dengan bertambahnya waktu dan durasi penyimpanan semen. Salah satu penyebabnya adalah adanya radikal bebas dalam jumlah yang berlebihan yang dapat merusak membrane plasma spermatozoa (Agung, dkk., 2023). Wijayanti, dkk., (2023) mengemukakan reaksi awal dari radikal bebas apabila tidak dikendalikan akan terjadi reaksi secara terus-menerus yang akhirnya dapat merusak sebagian besar atau seluruh membrane plasma spermatozoa. Untuk itu, Urgensi dalam penelitian ini menunjukkan perlu adanya metode yang dapat dilakukan dalam mempertahankan kualitas semen cair pada suhu rendah dengan menambahkan antioksidan pada bahan pengencer semen cair seperti *Glutathione* yang dapat mempertahankan kualitas semen (Telnoni, dkk., 2023). Ogata, et al., (2023) mengemukakan suplementasi *Glutathione* pada pengencer semen beku dapat meningkatkan produksi embrio in vitro. Antioksidan adalah senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya kerusakan membran plasma spermatozoa yang disebabkan oleh radikal bebas dengan cara menangkal aktivitas radikal bebas atau memutus rantai reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Zou, et al., 2021). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas dengan jalan meredam aktivitas radikal bebas atau memutus rantai reaksi oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas (Maulana, dkk., 2016) ; (Pratiwi, dkk., 2019). Lebih lanjut, Zou, et al., (2021) ; Solihati, et al., (2018) mengemukakan penggunaan *Glutathione* dalam media pengencer diharapkan dapat mengurangi timbulnya radikal bebas yang dapat merusak membran plasma. Shah, et al., (2018) penambahan *Glutathione* membantu kelangsungan hidup spermatozoa sapi jantan dengan cara mengganggu jalur apoptosis dan

kriokapitasi dengan demikian melindungi spermatozoa dari efek buruk kriopreservasi pada semen beku. Berdasarkan pemikiran diatas, maka penelitian untuk menguji Suplementasi Level *Glutathione* Pada Pengencer Semen Cair Dalam Mempertahankan Kualitas Semen Sapi Peranakan Ongole (PO) Selama Simpan Dingin.

MATERI DAN METODE

Materi

Pada penelitian ini menggunakan semen sapi yang dikoleksi dari pejantan sapi Peranakan Ongole (PO) berumur sekitar 2-3 tahun yang diperoleh dari Laboratorium Lapang Universitas Muhammadiyah Gorontalo. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa $\geq ++$, motilitas individu $\geq 70\%$. Frekuensi penampungan semen satu minggu dua kali.

Metode

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 Perlakuan dan 10 ulangan. Pengelompokan berdasarkan waktu penampungan semen yang berbeda. Sedangkan perlakuan terdiri dari P0 (kontrol) = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15%. P1 = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% + Glutathione 0,75 mM. P2 = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% + Glutathione 1 mM. P3 = pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% + Glutathione 1,25 mM.

Pengencer Semen Cair Ekstrak Buah Merah

Bahan pengencer ekstrak buah merah dimana buah merah ditimbang 100 gr, ditambahkan aquades 300 ml, selanjutnya dibelender selama 5 menit, kemudian diamkan selama 2,5 jam agar cairan mengendap setelah itu disaring menggunakan kain saring, penyaring dilakukan selama 2 kali. Penyaring kedua menggunakan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak buah merah, kemudian ditambahkan fruktosa 10 dan 20 mg/ml, antibiotik penicilin 1 mg/ml, sorbitol g/L, streptomycin sulfat 1 mg/ml dan gentamicin 0,05 g/ml. Setelah pengencer ekstrak buah merah dibuat, untuk penggunaan selanjutnya ditambahkan kuning telur sebagai pelindung membran. Bahan tambahan kuning telur akan ditambahkan ke pengencer ekstrak buah merah dengan konsentrasi 100%. Kemudian di stirer selama 30 menit setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit. Pengencer ekstrak buah merah dengan bahan tambahan kuning telur 15% disimpan dalam refrigerator suhu 3-

5°C kemudian pengencer ekstrak buah merah + kuning telur 15% siap untuk digunakan (Ervandi, dkk., 2023).

Variabel Penelitian

Perubahan yang diamati adalah motilitas, viabilitas dan abnormalitas sesuai dengan perlakuan yang ada.

Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa diamati dengan meneteskan semen pada *object glass*, kemudian ditutup dengan *cover glass*, selanjutnya diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 10 X 40 (Kusumawati, dkk., 2018). Menghitung motilitas spermatozoa berdasarkan rumus (Azzahra dkk., 2016).

$$M = [(Y - X) / Y] \times 100\%$$

Keterangan: X = Spermatozoa tidak motil

Y = Konsentrasi total spermatozoa

Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas diamati dengan pewarnaan dengan *eosin-negrosin*. Semen diteteskan ke *object glass*. Setelah dihomogenkan, Usap menggunakan *object glass*. Mengeringkan preparat menggunakan pemanas sampai kering. Mikroskop digunakan untuk memeriksa objek dengan pembesaran 10 X 40. Spermatozoa berwarna terang dianggap hidup serta merah tua dianggap mati. Jumlah spermatozoa hidup dapat dihitung dari 200 pengamatan sel spermatozoa serta hasilnya dinyatakan pada persentase (Kusumawati, dkk., 2018).

$$X = \frac{a}{b} \times 100\%$$

Keterangan : X = daya tahan hidup spermatozoa

a = jumlah spermatozoa hidup

b = total spermatozoa diamati

Abnormalitas Spermatozoa

Preparat untuk pengamatan abnormalitas seperti preparat pengamatan hidup-mati yang diamati bentuk morfologinya. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop pemersaran 10 x 40. Hitung jumlah spermatozoa abnormal dari 200 sel spermatozoa, hasilnya dinyatakan dalam persentase (Kusumawati, dkk., 2018).

$$y = \frac{c}{d} \times 100\%$$

Keterangan : y = abnormalitas spermatozoa

c = jumlah spermatozoa abnormal,

d = jumlah spermatozoa diamati

Analisis Data

Data yang dihasilkan akan dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam. Selanjutnya apabila diantara perlakuan menunjukkan perbedaan nyata atau sangat nyata, akan dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*). Apabila perlakuan pengencer terbaik (EBM+KT+*Glutathione*) kemudian diuji menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40% (Sudarwati, dkk., 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Semen Segar Sapi PO

Kualitas semen segar sapi PO yang digunakan dalam penelitian ini memiliki motilitas diatas 70%. Kualitas semen segar yang dihasilkan disajikan pada Tabel 1.

Tabel. 1. Kualitas Semen Segar Sapi PO

Parameter	Rataan $\pm$ SD
Makroskopis	
Volume (ml)	6,14 $\pm$ 1,16
Warna	Krem
pH	6,40 $\pm$ 0,10
Aroma	Khas
Konsistensi	Kental
Mikroskopis	
Motilitas Massa	2+
Motilitas Individu (%)	76,40 $\pm$ 2,54
Viabilitas (%)	92,10 $\pm$ 2,05
Abnormalitas (%)	2,81 $\pm$ 0,33
Konsentrasi (10^7 /ml)	1351,09 $\pm$ 16,70

Pemeriksaan semen segar secara makroskopis yang dihasilkan dalam penelitian ini terdapat pada (Tabel 1) didapatkan rataan volume semen sapi PO 6,14 $\pm$ 1,16 ml lebih tinggi dari hasil penelitian Yekti, dkk., (2018) ; Mila, dkk., (2021) yaitu 4,17 $\pm$ 1,17 ml dan 4,6 $\pm$ 1,51. Setiawan dan Kurniawati (2020) meyakini bahwa volume semen sapi PO dalam satu ejakulasi yaitu sebesar 5-10 ml. Warna semen sapi PO yang dihasilkan yaitu krem, hasil ini dikategorikan baik dan juga normal. Susilawati, (2013) menyatakan bahwa semen normal berwarna putih kekuningan (krem) atau putih susu, derajat kekeruhan tergantung pada konsentrasi spermatozoa. Derajat keasaman (pH) semen sapi PO 6,40 $\pm$ 0,10 lebih rendah dari

hasil Yekti, dkk., (2018) ; Dzulqarnain, dkk., (2022) $6,63 \pm 0,08$ dan $6,42 \pm 0,23$. Kualitas semen segar sapi PO memiliki konsistensi kental. Ismaya, (2014) menyatakan bahwa konsistensi semen dapat diketahui dengan cara menggoyangkan tabung berisi semen secara perlahan-lahan dengan memprediksikan konsentrasi spermatozoa yaitu 1.000-2.000 juta/ml semen. Sudarmono, *et al.*, (2015) menyatakan bahwa semen yang baik memiliki poin penting yang harus diperhatikan yaitu kondisi semen setelah penampungan pada ternak sapi memiliki pH 6,45-6,57, konsentrasi 1223,7-1961,8, sedangkan motilitas individu 70% dan gerakan massa 2+. Secara mikroskopis rata-rata motilitas yang dihasilkan dikategorikan menjadi dua yaitu motilitas massa dan motilitas individu. Motilitas massa sapi PO yaitu 2+, sedangkan motilitas individu $76,40 \pm 2,54$ yang dihasilkan dalam penelitian. Hasil ini lebih tinggi dari Yekti, dkk., (2018) pada sapi PO yaitu $71,67 \pm 2,58$. Persentase viabilitas dan abnormalitas semen segar sapi PO masih dalam kisaran normal dan tergolong tinggi sesuai dengan pendapat Hidayati, *et al.*, (2021) ; Sari, *et al.*, (2020) viabilitas semen segar pada sapi Po yang disimpan dalam keadaan optimal mencapai 80% dan tingkat abnormalitas semen sapi PO rata-rata berkisar 12% hingga 18%. Berdasarkan pengamatan karakteristik semen segar sapi PO dalam penelitian ini memenuhi syarat kualitas untuk diproses ketahap selanjutnya.

Kualitas Semen Setelah Perlakuan

Rataan Motilitas Individu semen sapi PO setelah perlakuan tersaji pada Tabel 2. Motilitas individu sapi PO memperlihatkan daya tahan motilitas individu tertinggi pada pengencer P1 dan P2 mencapai 6 hari dengan nilai $44,21 \pm 1,19\%$ dan $40,36 \pm 1,32\%$ dibandingkan dengan P0 dan P3. Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan berbeda sangat Nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas individu sapi PO pada hari ke- 6 sampai hari ke- 8 masa simpan. Uji Beda Nyata Terkecil diperoleh hasil perkuan pengencer P1 dan P2 yang terbaik yaitu $44,21 \pm 1,19\%$ dan $40,36 \pm 1,32\%$ sampai hari ke- 6 selama masa simpan. Hasil ini tidak jauh berbeda dengan Maulana, dkk., (2016) penambahan *glutathione* 0,75 mM dan 1 mM memiliki hasil yang lebih tinggi pada ternak sapi limosin. Ramírez *et al.* (2023), menambahkan bahwa penambahan *Glutathione* (GSH) pada konsentrasi 1 mM secara signifikan meningkatkan **motilitas progresif** spermatozoa selama penyimpanan semen cair pada suhu 4°C. Berbeda dengan penelitian Sharma dan Agarwal (2020), dosis *Glutathione* (GSH) pada 1 mM memiliki efek yang lebih kuat dalam mengurangi stres oksidatif dibandingkan 0,75 mM, yang berimplikasi pada peningkatan kualitas semen cair dalam jangka waktu lebih lama. Hal ini kemungkinan disebabkan karena suplementasi level

glutathione pada pengencer ekstrak buah merah dan kuning telur dapat mempertahankan kualitas semen selama proses penyimpanan. Zhang et al. (2021), suplementasi *glutathione* pada pengencer berfungsi sebagai antioksidan, melindungi sel dari kerusakan oksidatif dan mendukung proses detoksifikasi. Ahmad et al., (2021) melaporkan bahwa penambahan *glutathione* mengurangi tingkat peroksidasi lipid dan membantu mempertahankan stabilitas membrane semen selama penyimpanan semen cair pada suhu 4°C. Hal ini berperan penting dalam mempertahankan **integritas morfologi semen**, terutama pada penyimpanan semen cair jangka panjang. Zou, et al., (2021) ; Solihati, et al., (2018) mengemukakan penggunaan

Glutathione dalam media pengencer diharapkan dapat mengurangi timbulnya radikal bebas yang dapat merusak membran plasma. Shah, et al., (2018) penambahan *Glutathione* membantu kelangsungan hidup spermatozoa sapi jantan dengan cara menghambat jalur apoptosis dan kriokapitasi dengan demikian melindungi spermatozoa dari efek buruk kriopreservasi pada semen. Khan et al. (2020) menunjukkan bahwa suplementasi *glutathione* pada semen cair sapi secara signifikan menurunkan fragmentasi DNA.

Tabel 2. Rataan Motilitas Individu Sapi PO dengan Berbagai Level *Glutathione* Pengencer Selama Simpan Dingin

Keterangan : Superskrip pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan

Hasil penelitian, Perlakuan P0 motilitas bertahan hingga hari ke- 5 diikuti P3 pada masa

Perlakuan	Rata-rata Motilitas (%) $\pm$ SD								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
P0 (EMB + KT 15%)	70,31 $\pm$ 1.38	60,15 $\pm$ 1.29	58,76 $\pm$ 1.20	45,11 $\pm$ 0.19	40,14 $\pm$ 0.17	39,10 $\pm$ 0.15 ^b	35,16 $\pm$ 1.11 ^b	18,51 $\pm$ 1.10 ^b	14,20 $\pm$ 0.12 ^b
P1 (EBM+ KT 15%+Gthn 0,75 mM)	70,34 $\pm$ 1.14	69,16 $\pm$ 1.32	65,17 $\pm$ 1.24	60,57 $\pm$ 1.28	55,19 $\pm$ 1.20	44,21 $\pm$ 1.19 ^{ab}	38,29 $\pm$ 1.11 ^{ab}	23,41 $\pm$ 0.09 ^{ab}	19,21 $\pm$ 0.00 ^{ab}
P2 (EBM+ KT 15%+ Gthn 1 mM)	66,13 $\pm$ 1.31	60,54 $\pm$ 1.56	50,32 $\pm$ 1.48	48,14 $\pm$ 1.33	45,26 $\pm$ 1.20	40,36 $\pm$ 1.32 ^{ab}	24,78 $\pm$ 0.20 ^b	15,28 $\pm$ 0.10 ^b	08,32 $\pm$ 0.00 ^b
P3 (EBM+ KT 15%+ Gthn 1,25 mM)	60,41 $\pm$ 1.31	50,12 $\pm$ 1.27	43,11 $\pm$ 1.24	40,61 $\pm$ 1.16	38,17 $\pm$ 1.17	30,28 $\pm$ 0.10 ^b	21,19 $\pm$ 0.08 ^b	09,51 $\pm$ 0.04 ^b	06,10 $\pm$ 0.00 ^b

simpan semen. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena efek toksik yang muncul akibat akumulasi komponen antioksidan yang berlebihan dalam media penyimpanan semen cair.

Hasil penelitian Rivera et al., (2020), menunjukkan bahwa konsentrasi *Glutathione* (GSH) yang lebih tinggi dari 1 mM dapat mengganggu sistem reduksi spermatozoa, yang mengarah pada penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Ketidakseimbangan ini justru bisa menyebabkan produksi ROS yang tinggi secara tidak langsung dan memperburuk kerusakan spermatozoa. Sharma et al., (2021) menunjukkan bahwa penambahan *glutathione* di atas 2 mM menyebabkan penurunan motilitas progresif dan meningkatkan kematian spermatozoa. Martinez et al., (2021), menunjukkan bahwa pemberian *glutathione* dalam konsentrasi tinggi dapat menyebabkan deformasi kepala dan ekor spermatozoa. Pengaruh ini berkaitan dengan perubahan membran plasma spermatozoa akibat peran *glutathione* yang tidak seimbang dalam lingkungan penyimpanan semen. Hernandez et al. (2019) mengungkapkan bahwa spermatozoa yang disimpan dengan *glutathione* pada konsentrasi di atas 1,5 mM menunjukkan penurunan kemampuan penetrasi terhadap oosit, yang mengakibatkan penurunan tingkat keberhasilan pembuahan dalam program IB.

Tabel 3. Rataan Viabilitas Spermatozoa Sapi PO dengan Berbagai Level *Glutathione* Pada Pengencer Selama Simpan Dingin

Perlakuan	Rata-rata Viabilitas Spermatozoa (%) ± SD								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
P0 (EMB + KT 15%)	70,11 ± 1.11	63,41± 1.10	57,66 ± 0.13	50,60 ± 0.36	40,10 ± 0.57 ^a	33,13 ± 0.12 ^a	29,10 ± 1.13 ^a	16,11 ± 1.12 ^a	10,14 ± 0.19 ^a
P1 (EBM+ KT 15%+Gthn 0,75 mM)	70,60 ± 1.20	67,13 ± 1.16	63,20 ± 1.10	50,10 ± 1.06	43,19 ± 1.22 ^{ab}	40,61± 1.11 ^{ab}	33,18 ± 0.18 ^{ab}	20,51 ± 0.27 ^{ab}	16 ± 0.00 ^{ab}
P2 (EBM+ KT 15%+ Gthn 1 mM)	69,74 ± 1.52	60,13 ± 0.49	50,17 ± 0.32	46,10 ± 0.26	37,22 ± 1.12 ^a	31,19± 0.15 ^a	24,10 ± 0.14 ^a	19,13 ± 0.20 ^a	09,12± 0.09 ^a
P3 (EBM+ KT 15%+ Gthn 1,25 mM)	65,21 ± 1.21	60,10 ± 0.38	50,19 ± 0.28	40,35 ± 1.14	31,14± 1.16 ^a	29,23 ± 0.20 ^a	18,10 ± 0.11 ^a	10,27 ± 0.30 ^a	05 ± 0.01 ^a

Keterangan : Superskrip pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan

Rataan viabilitas semen sapi PO setelah perlakuan tersaji pada Tabel 3. Viabilitas sapi PO memperlihatkan kemampuan daya tahan hidup tertinggi pada pengencer P1 mencapai 6 hari dengan nilai 40,61 $\pm$ 1.11 %, sedangkan pengencer P0 dengan nilai viabilitas 40,10 $\pm$ 0.57% hanya memiliki rata-rata daya tahan hidup spermatozoa mencapai 5 hari dibandingkan P2 dan P3. Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan berbeda Nyata ($P < 0,01$) terhadap daya

tahan hidup spermatozoa sapi PO pada hari ke- 6 hingga hari ke- 9 masa simpan. Hasil ini kemungkinan disebabkan karena adanya *Glutathione* pada pengencer semen cair yang berperan sebagai antioksidan yang kuat dalam melindungi spermatozoa serta menetralkan dari kerusakan oksidatif. *Glutathione* berperan penting dalam menetralkan *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang terbentuk selama penyimpanan semen cair, yang sering kali menyebabkan penurunan kualitas semen. *Glutathione* berfungsi sebagai senyawa antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas dan melindungi spermatozoa dari stres oksidatif yang dapat menyebabkan kerusakan pada membran sel spermatozoa serta menurunkan viabilitasnya (Zhang, et al., 2021). De Matos et al., (2020), mengemukakan bahwa penambahan *glutathione* pada pengencer semen meningkatkan persentase motilitas progresif, viabilitas dan menurunkan persentase spermatozoa abnormal. Penggunaan *glutathione* sebagai aditif dalam pengencer semen juga mendukung pemeliharaan aktivitas enzimatis yang bertanggung jawab atas pertahanan antioksidan alami dalam spermatozoa (Martínez et al., 2021). El-Sheshtawy et al., (2019) melaporkan bahwa penambahan *glutathione* dengan konsentrasi yang tepat dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa selama penyimpanan semen cair. *Glutathione* juga diketahui mendukung stabilitas DNA spermatozoa, meningkatkan peluang keberhasilan fertilisasi (Ahmed et al., 2021). Perlindungan terhadap stres oksidatif oleh *glutathione* tidak hanya meningkatkan viabilitas, tetapi juga membantu menjaga integritas akrosom dan mengurangi kerusakan pada membran plasma spermatozoa (Ali et al., 2020).

Viabilitas pada perlakuan P0 bertahan hingga hari ke- 5 diikuti, P2 dan P3 pada masa simpan semen. Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena pemberian *glutathione* pada konsentrasi yang tidak sesuai dapat bersifat toksik dan justru merusak struktur serta fungsi spermatozoa selama proses penyimpanan semen cair pada suhu 4-5°C. Hasil penelitian Ahmadi, et al., (2023) memperingatkan bahwa dosis *glutathione* di atas 1,5 mM dapat bersifat toksik bagi spermatozoa, menyebabkan penurunan motilitas dan viabilitas akibat akumulasi antioksidan berlebih yang dapat mengganggu metabolisme spermatozoa. Konsentrasi *glutathione* 0.75 mM dianggap efektif dalam meningkatkan kualitas semen, terutama dalam menjaga motilitas dan mengurangi angka spermatozoa mati selama penyimpanan semen cair (Singh et al., 2020). Silva et al., (2019), konsentrasi *glutathione* yang lebih tinggi dapat menyebabkan efek prooksidan dalam kondisi tertentu, yang berpotensi merusak spermatozoa. Ahmadi et al., (2023) mengemukakan bahwa dosis 0,75 mM hingga 1 mM *glutathione* dapat memberikan manfaat optimal terhadap viabilitas spermatozoa, dosis yang

lebih tinggi, seperti di atas 1,5 mM, justru dapat merusak spermatozoa dan menurunkan viabilitasnya. Hal ini menunjukkan bahwa optimalisasi konsentrasi *glutathione* sangat penting untuk mencapai hasil terbaik dalam menjaga viabilitas spermatozoa selama penyimpanan semen cair.

Tabel 4. Rataan Abnormalitas Spermatozoa Sapi PO Pada Berbagai Level *Glutathione* Pengencer Selama Simpan Dingin

Perlakuan	Rata-rata Abnormalitas Spermatozoa (%) $\pm$ SD								
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9
P0 (EMB + KT 15%)	4,11 $\pm$ 0.11	5,21 $\pm$ 1.19	5,81 $\pm$ 0.14	6,13 $\pm$ 0.66	7,33 $\pm$ 0.81	8,51 $\pm$ 0.13	14,41 $\pm$ 1.19	15,19 $\pm$ 1.20	17,85 $\pm$ 0.10
P1 (EBM+ KT 15%+Gthn 0,75 mM)	3,10 $\pm$ 0.12	3,22 $\pm$ 0.19	4,31 $\pm$ 0.14	5,65 $\pm$ 0.11	6,26 $\pm$ 1.30	7,53 $\pm$ 0.22	12,36 $\pm$ 0.28	13,88 $\pm$ 0.30	15,30 $\pm$ 0.44
P2 (EBM+ KT 15%+ Gthn 1 mM)	6,59 $\pm$ 0.18	7,76 $\pm$ 1.26	7,10 $\pm$ 1.21	8,42 $\pm$ 1.32	9,19 $\pm$ 1.67	10,33 $\pm$ 1.56	15,70 $\pm$ 0.63	16,05 $\pm$ 1.18	18,41 $\pm$ 0.67
P3 (EBM+ KT 15%+ Gthn 1,25 mM)	7,61 $\pm$ 1.26	7,90 $\pm$ 0.28	8,61 $\pm$ 1.85	9,14 $\pm$ 1.18	10,90 $\pm$ 0.54	13,03 $\pm$ 1.75	14,21 $\pm$ 0.12	15,60 $\pm$ 0.15	19,01 $\pm$ 0.55

Keterangan : Superskrip pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan

Rataan abnormalitas semen sapi PO setelah perlakuan tersaji pada Tabel 4. Spermatozoa yang mempunyai penyimpangan morfologi berbeda dari spermatozoa yang normal disebut abnormal dan akan mempengaruhi tingkat fertilisasi. Abnormalitas spermatozoa sapi PO yang memberikan hasil terbaik pada pengencer P1 mulai dari ke-1 hingga hari ke-9, kemudian P0 disusul P2 dan P3. Hasil analisis ragam menunjukkan perlakuan berbeda Nyata ($P < 0,01$) terhadap abnormalitas spermatozoa sapi PO selama simpan dingin. Rataan abnormalitas spermatozoa pada penelitian ini dikategorikan normal karena tidak melebihi dari 20%. Menurut Zhang et al., (2021), penambahan *Glutathione* (GSH) pada konsentrasi 0.75 mM secara signifikan dapat mengurangi abnormalitas morfologi spermatozoa selama penyimpanan. Ramu, et al., (2018) menunjukkan bahwa penambahan *glutathione* pada konsentrasi optimal 0,75 mM dalam pengencer semen sapi dapat mengurangi abnormalitas spermatozoa.

Glutathione berperan dalam melindungi membran spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dan stres oksidatif selama penyimpanan pada suhu 4-5°C, sehingga mempertahankan morfologi spermatozoa yang lebih baik. Namun, pada konsentrasi yang lebih tinggi 1-1,5 mM, efek toksisitas mulai terlihat, yang mengakibatkan peningkatan abnormalitas pada spermatozoa sapi PO. Bansal et al., (2020), penambahan *glutathione* pada konsentrasi di atas 1 mM dapat memicu peningkatan abnormalitas struktural spermatozoa karena keracunan antioksidan. Al-Badry, et al., (2019) menemukan bahwa penggunaan *glutathione* dapat melindungi spermatozoa dari kerusakan yang disebabkan oleh oksidasi lipid, sehingga mengurangi abnormalitas kepala dan ekor spermatozoa. *Glutathione*, yang merupakan antioksidan tripeptida alami, diketahui memiliki kemampuan untuk melawan stres oksidatif yang dapat merusak membran spermatozoa dan menyebabkan abnormalitas struktural (Agarwal, et al., 2020). Stres oksidatif sering diinduksi selama proses pendinginan semen, yang mengakibatkan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS). ROS dapat merusak DNA, lipid, dan protein dalam spermatozoa, sehingga memperburuk abnormalitas pada spermatozoa (Fazeli et al., 2017).

KESIMPULAN

Pengencer EBM+ KT 15%+Gthn 0,75 mM memiliki kualitas lebih tinggi dengan lama simpan mencapai 6 hari dengan motilitas individu $44,21 \pm 1.19\%$ dan viabilitas $40,61 \pm 1.11\%$ dengan abnormalitas <20% setelah penyimpanan. Suplementasi level *glutathione* 0,75 mM pada pengencer semen cair EBM+KT 15% merupakan dosis yang optimal dalam menghasilkan motilitas, viabilitas dan abnormalitas yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., S. Gupta, & R.K. Sharma. 2020. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18 (1), 10-15.
- Agung, D.S., A. Marawali, K. Uly, & F.M.S. Telupere. 2023. Pengaruh Penambahan Beberapa Level Glutathione Dalam Pengencer Air Kelapa Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Sapi Angus. *Jurnal Nukleus Peternakan*. 10 (1): 27 – 37.
- Ahmad, E., S.H. Wani & V.P. Maury. 2021. Effect of Glutathione on Cryopreserved Bull Semen: A Review. *Journal of Animal Reproduction Science*, 45 (3) : 233-245.
- Ahmadi, N., R. Jamshidi, & A. Golkar. 2023. Effects of High Levels of Glutathione on Sperm DNA Integrity and Motility in Bull Semen. *Journal of Animal Reproduction Science*, 45 (2) : 245-258.

- Ahmed, S., M. Khalid, & A. Shaikh. 2021. Effects of glutathione on sperm DNA integrity in cryopreserved bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 227, 106741.
- Al-Badry, K. I., J.E. Alkass, & O.I. Azawi. 2019. Protective effects of glutathione and selenium on semen quality during cryopreservation of bull semen. *Journal of Animal Reproduction*, 40 (3) : 235-242.
- Ali, A., M. Anzar., & S. Jaha. 2020. The role of antioxidants in preserving spermatozoa viability in cattle. *Theriogenology*, 149, 1-9.
- Astuti, M. E. 2018. Pengaruh Penambahan Sari Buah Tomat (*Solanum lycopersicum*) Sebagai Pengencer Alami Terhadap Kualitas Penyimpanan Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*). *Bionature*. 18 (2):129-139.
- Azzahra, F. Y., E.T. Setiatin, & D. Samsudewa. 2016. Evaluasi Motilitas dan Persentase Hidup Semen Segar Sapi PO Kebumen Pejantan Muda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 11 (2), 99-107.
- Bansal, A. K., & G.S. Bilaspuri. 2020. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary World*, 13 (2), : 203-210.
- Dacosta, N., T. Susilawati, N. Isnainid & M.N. Ihsan. 2016. Effect of Different Dilution Materials Usage on Indonesia Peranakan Ongole Bull Sperm Quality During Cooling Process. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3 (4) : 379-385
- De Matos, D. G., S. Garcia, & A.J. Conley, 2020. Glutathione supplementation improves sperm quality in cooled bovine semen. *Theriogenology*, 148, 42-48.
- Dzulqarnain, A., T. Saili, dan M. Rusdin. 2022. Kualitas Spermatozoa Sapi Bali Setelah Preservasi Menggunakan Pengencer Tris Kuning Telur dan Madu Dengan Level Berbeda. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu*. 4 (3) : 236-242
- El-Sheshtawy, R., W.K. Khalil, & H.G. Abo-Al-Ela. 2019. Effect of glutathione on the quality of cooled bovine semen. *Journal of Animal Science*, 97 (2) : 529-537.
- Ervandi, M. S. Mokoolang, W. Ardiansyah & Suci Ananda. 2023. Efektivitas Kombinasi Ekstak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk) dan Air Kelapa Hijau Terhadap Kualitas Semen Sapi Bali Selama Simpan Dingin. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*. 9 (2) : 161-176.
- Ervandi, M., M. N. Ihsan, S. Wahjuningsih, & T. Susilawati. 2020. Pregnancy Rate and Reproductive Disorders Examination of Inseminated Brahman Cross by Rectal Palpation and Ultrasonography. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 15 (1), 73-80
- Ervandi, M., M. N. Ihsan, S. Wahjuningsih, A.P.A. Yekti, & T. Susilawati. 2020. Relationship between body condition score on the service per conception and conception rate of BX cows. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 30 (1): 80-85
- Fazeli, Z., H. Gholami, & H. Mohammadi. 2017. The impact of antioxidants on the freezing and thawing processes of bull sperm. *Cryobiology*, 74 (3): 21-29.
- Hernandez, J., M. Morales, & D. Lopez, .2019. High Concentrations of Glutathione Reduce Fertilization Rate in Bull Semen Stored at Low Temperatures. *Theriogenology*, 132, 98-104
- Hidayati, F., & S. Sumarni. 2021. Pengaruh Metode Pengumpulan terhadap Viabilitas Semen Segar Sapi Perah Ongole. *Jurnal Veteriner Indonesia*. 12 (1), 45-52.
- Ismaya. 2014. Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Istiqomah, H. N., M. Ervandi, I. Korompot, T. Repi, & I.S. Buhang. 2023. Kualitas Semen Beku Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Pada Lama Thawing yang Berbeda di Dinas Pertanian Provinsi Gorontalo. *Jurnal Ilmu dan Industri Peternakan*. 9 (1) : 20-30.
- Kasimanickam, R., K. Vanmathy, A. Tibary, & K. Pelzer., 2011. Effect Of Semen Extenders On Sperm Parameters Of Ram Semen During Liquid Storage at 4°C. *Small Rumin Res*. 99 : 208-213.

- Khan, S., N. Ahmad, & H. Ullah. 2020. Glutathione Addition Improves DNA Integrity and Motility of Bull Sperm During Liquid Storage. *Journal of Animal Science and Technology*, 62 (3) : 321-329.
- Kusumawati, E. D., S. Rahadi, S. Santoso, & D. L. Yulianti. 2018. Pengaruh Lama Thawing yang Berbeda pada Suhu 25°C Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Ongole. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 6 (1) : 119-123.
- Malik A, R. Fauzi, M.I. Zakir, & S. Sakiman. 2018. Substitusi Madu Asli Pengganti Gliserol dalam Pembekuan pada Kualitas Pasca-thawing Spermatozoa Sapi Bali. *Acta Veterinaria Indonesia*. 5 (2):98-104.
- Marawali A, M.S Abdullah, & J. Jalaludin. 2019. Efektivitas Suplementasi Filtrat Jambu Biji dalam Pengencer Air Kelapa-Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Bali. *Jurnal Veteriner*. 20(1):20-29.
- Martinez, P., F. Santos, & R. Garcia. 2021. Impact of Glutathione on Morphological Changes in Bull Spermatozoa During Cryopreservation. *Andrology*, 9 (2) : 215-225.
- Maulana, R., N. Isnaini & S. Wahjuningsih. 2016. Pengaruh Penambahan Glutathione Pada Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur Dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Suhu Ruang . *Jurnal Ternak Tropika*. 17 (1) : 57-65.
- Maulana, R., N. Isnaini & S. Wahjuningsih. 2016. Pengaruh Penambahan Glutathione Pada Pengencer Tris Aminomethane Kuning Telur Dalam Mempertahankan Kualitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan Suhu Ruang. *Jurnal Ternak Tropika*. 17 (1) : 57-65.
- Mila, F.N. H., Y. S. T. Ina & A. Kaka, .2021. Karakteristik dan Kualitas Semen Sapi Sumba Ongole dalam Pengencer Tris yang Disuplementasi dengan Susu Skim yang Disimpan pada Suhu 3-5 °C. *Jurnal Sains dan Teknologi Peternakan*. 3 (1) : 12-18
- Ogata, K., A. Imai, S. Sato, K. Nishino, S. Watanabe, T. Somfai, E. Kobayashi & K. Takeda. 2022. Effects of reduced glutathione supplementation in semen freezing extender on frozen-thawed bull semen and in vitro fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 68 (1) : 53-61.
- Pratiwi, N., T. L. Yusuf, I. Arifiantini, & C. Sumantri. 2019. Kualitas Spermatozoa dalam Modifikasi Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur dengan Tambahan Astaxanthin dan Glutathione pada Tiga Jenis Ayam Lokal. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 7 (1) : 46-54.
- Ramírez, R., G. Martínez & J. Bautista. 2023. The Protective Role of Glutathione in Bull Semen Cryopreservation and Post-thawing Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 58(2), 150-159.
- Ramu, S., S. Balamurugan, & S. Balasubramanian. 2018. Glutathione supplementation to semen extender improves the post-thaw quality and fertility of bull spermatozoa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9 (1): 15-20
- Rivera, A., N. Castro, & L. Gutierrez. 2020. Negative Effects of Over-Supplementation of Glutathione on Redox Homeostasis and Sperm Motility in Bull Semen. *Journal of Animal Reproduction Science*, 218, 106567.
- Sari, D. P., & R.A. Putra. 2020. Analisis Abnormalitas Morfologi Sperma pada Sapi Perah Ongole. *Jurnal Veteriner*. 21 (1) 88-95.
- Setiawan, A., & R. Kurniawati. 2020. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Kualitas Semen pada Sapi PO. *Jurnal Peternakan Berkelanjutan*. 19(1), 60-66.
- Shah, N. V. Singh, H. P. Yadav, M. Verma, D. S. Chauhan, A. Saxena, S. Yadav, & D. K. Swain. 2017. Effect of reduced glutathione supplementation in semen extender on tyrosine

- phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Hariana bull spermatozoa. *Journal Animal Reproduction Science*. 182 : 111-122.
- Sharma, R., S. Singh, & P. Verm. 2021. Dose-Dependent Effects of Glutathione on Sperm Quality Parameters in Bull Semen Cryopreservation. *Journal of Dairy Science*, 104 (3) : 3551-3561.
- Sharma, R., S. Singh, & P. Verma. 2021. Dose-Dependent Effects of Glutathione on Sperm Quality Parameters in Bull Semen Cryopreservation. *Journal of Dairy Science*, 104 (3) : 3551-3561.
- Silva, A. M., P. Rodriguez, & E. Nogueira. 2019. Prooxidant effects of glutathione supplementation at high concentrations in bovine spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 97 (3) : 1148-1156.
- Singh, A., A. Verma, & R. Sharma. 2020. Antioxidant supplementation improves the viability and motility of cattle spermatozoa during cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 55 (3) : 281-287.
- Solihati, N., S.D. Rasad, R. Setiawan, E.N. Foziah, & E.T. Wigiyanti. 2018. Semen Quality Of Post-Thawed Local Ram's In Tris-Egg Yolk Extender With Different Glutathione Level. *IOP Conference Series*. Vol 119. doi :10.1088/1755-1315/119/1/012034
- Sudarmono, A., Budiarto, A., & Rahardjo, M. 2015. Analisis Kualitas Semen Sapi pada Berbagai Metode Pembekuan. *Jurnal Ilmu Ternak*, 10(2), 123-130.
- Sudarwati, H., M. H. Natsir & V.M. A. Nurgiatiningsih. 2019. Statistika dan Rancangan Percobaan Penerapan Dalam Bidang Peternakan. Universitas Brawijaya (UB Press). Malang.
- Sumadiasa, I.L., T. Susilawati, G. Ciptadi, dan N. Isnaini. 2015. The Potency of Guava Filtrate (*Psidium guajava* linn) for Preservation of Bali Bull Spermatozoa. *IOSRJournal of Agriculture and Veterinary Science*. 8 (5):5157.
- Susilawati, T. 2013. Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak. UB Press. Malang
- Susilawati, T., Isnaini, N., Yekti, A. P. A., Nurjannah, I., Errico, E., & Dacosta. 2016. Keberhasilan inseminasi buatan menggunakan semen beku dan semen cair pada sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 26 (3), 14-19.
- Telnoni, S.P., M. Fahik, & G. Y. Baon. 2023. Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos Sondaicus*) Pada Pengencer Tris Kuning Telur Dengan Penambahan Glutathione. *Jurnal Flobamora Biological*.1 (2) : 8-15
- Tethool, A.N., A. R. Ollong & J. F. Koibur. 2021. Pengaruh Sari Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam) terhadap Abnormalitas Spermatozoa Ayam Kampung. *Jurnal Ilmu Peternakan dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*. 11 (2): 92 – 98
- Wijayanti, A., T. W. Suprayogi, R. A. Prastiya, T. Hernawati, T. Sardjito, A. L. Saputro, A. Amaliya, & D. Sulistyowati. 2023. Pengaruh Penambahan Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*) dalam Diluter Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Setelah Pembekuan. *Jurnal Medik Veteriner*. 6 (1) : 66-74.
- Yekti, A.P.A., W. S. Tatulus, D. Ratnawati, L. Affandhy, Kuswati, A.N. Huda, & T. Susilawati. 2018. Kualitas Dan Kapasitas Spermatozoa Sapi Bali, Madura, Dan Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*. 5 (2) : 34-41
- Zhang, X., Y. Zhang, X. Liu & L. Zhang. 2021. Effects of reduced glutathione supplementation in semen freezing extender on frozen-thawed bull semen and in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science*, 233, 106845.

Zou, J., L. Wei , D.Li , Y. Zhang, G. Wang, L. Zhang, P. Cao, S. Yang & G. Li . 2021. Effect of Glutathione on Sperm Quality in Guanzhong Dairy Goat Sperm During Cryopreservation. Sec. Animal Reproduction – Theriogenology. 8 : 1-6.