

## Efek Suplementasi L-cysteine, Selenium, dan Kombinasinya terhadap Kualitas Spermatozoa pada Kriopreservasi Semen Sapi Peranakan Ongole

### *Effects of L-cysteine, Selenium, and Their Combinations on Spermatozoa Quality in Semen Cryopreservation in Ongole Cattle*

Ahmad Syarifuddin<sup>1,2</sup>, Asmarani Kusumawati<sup>1\*</sup>, Sarmin<sup>1</sup>, Sri Gustari<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Sain Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Program Studi D3 Kesehatan Hewan, Fakultas Peternakan, Universitas Jambi, Jambi, Indonesia

\*Email: [uma\\_vet@ugm.ac.id](mailto:uma_vet@ugm.ac.id)

Naskah diterima: 5 Juni 2023, direvisi: 11 Juli 2024, disetujui: 17 November 2025

#### Abstract

The impact of decreasing the quality of spermatozoa during semen cryopreservation due to reactive oxygen species (ROS) can be anticipated by adding antioxidants. Antioxidants that can be used are l-cysteine, selenium, and their combinations. This study aims to determine the effect of adding antioxidants l-cysteine, selenium, and their combination on the quality of spermatozoa during the semen cryopreservation process of PO cattle. This study used 5 PO cattle (5-10 years) kept at the Artificial Insemination Center (BIB) Lembang. Semen was collected from five cows, and one ejaculation was taken each using an artificial vagina. Each ejaculate was divided into four parts; each part was diluted with diluent A (skim milk and egg yolk), followed by diluent B (skim milk, egg yolk, glycerol and glucose) at 37°C. Part 1 (control), part 2 (1 mM l-cysteine), part 3 (0,05 mM selenium), and part 4 (a combination of 1 mM l-cysteine + 0,05 mM selenium) were then put into the cool top to be equilibrated at 4°C for 2-3 hours and checked for motility. Semen is put into straws and frozen in a container containing liquid nitrogen. Frozen semen thawing was performed at 37°C for 30 seconds, followed by examining spermatozoa motility, recovery rate, and viability. The result showed that the highest percentage of motility, recovery rate, and viability of spermatozoa was cement with the addition of l-cysteine (1mM) and selenium (0,05 mM) at values (48.00 ± 2.73), (67.60 ± 3.85), (67.88 ± 3.88) and (46.00 ± 2.23), (64.78 ± 3.14), (65.10 ± 4.02). The conclusion shows that the antioxidants l-cysteine and selenium can increase the motility, recovery rate, and viability of post-thawing spermatozoa in PO cattle.

**Keywords:** PO Cattle; cryopreservation; L-cysteine; selenium

#### Abstrak

Dampak penurunan kualitas spermatozoa selama kriopreservasi semen akibat adanya *reactive oxygen species* (ROS) dapat diantisipasi dengan antioksidan. Antioksidan yang bisa digunakan adalah l-cysteine, selenium, dan kombinasinya. Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan antioksidan l-cysteine, selenium dan kombinasinya terhadap kualitas spermatozoa selama proses kriopreservasi semen sapi PO. Penelitian ini menggunakan 5 ekor sapi PO (5-10) tahun yang dipelihara di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang. Semen dikoleksi dari 5 ekor sapi tersebut masing-masing diambil 1 ejakulat dengan menggunakan vagina buatan. Setiap ejakulat dibagi menjadi empat bagian, masing-masing bagian diencerkan dengan kuning telur dan susu skim (pengencer A), dilanjutkan dengan pengencer B (gliserol, susu skim, glukosa, dan kuning telur) pada suhu 37°C. Bagian 1 (kontrol), bagian 2 (1 mM l-cysteine), bagian 3 (0,05 mM selenium), dan bagian 4 (kombinasi 1 mM l-cystein + 0,05 mM selenium), selanjutnya dimasukkan ke dalam cool top untuk di equilibrasi pada suhu 4°C selama 2-3 jam dan dilakukan pemeriksaan motilitas. Semen dimasukkan ke dalam straw dan dibekukan dalam container yang mengandung nitrogen cair. *Thawing* semen beku pada suhu 37°C selama 30 detik dilanjutkan dengan

pemeriksaan motilitas spermatozoa, viabilitas spermatozoa, dan *recovery rate*. Hasil menunjukkan persentase motilitas, *recovery rate*, dan viabilitas spermatozoa yang paling tinggi adalah semen dengan penambahan l-cysteine (1mM) dan selenium (0,05 mM) berturut-turut pada nilai  $(48,00 \pm 2,73)$ ,  $(67,60 \pm 3,85)$ ,  $(67,88 \pm 3,88)$  dan  $(46,00 \pm 2,23)$ ,  $(64,78 \pm 3,14)$ ,  $(65,10 \pm 4,02)$ . Simpulan menunjukkan bahwa antioksidan l-cysteine dan selenium dapat meningkatkan motilitas, *recovery rate*, dan viabilitas spermatozoa *post thawing* pada sapi PO.

**Kata kunci:** Kriopreservasi; L-cysteine; sapi PO; selenium

## Pendahuluan

Salah satu kendala yang menghalangi proses pembekuan spermatozoa adalah tingkat stres oksidatif yang tinggi yang disebabkan oleh spesies reaktif oksigen (ROS) karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. ROS merupakan atom yang sangat reaktif dan tidak stabil dan akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk mendapatkan pasangan elektron untuk mencapai kestabilan atom. Salah satu penghalang spermatogenesis adalah kadar ROS yang tinggi. Berlebihan ROS pada spermatozoa berbahaya karena mengurangi jumlah sperma fungsional (Rath *et al.*, 2009). Membran spermatozoa mamalia rentan teroksidasi oleh ROS karena jumlah asam lemak tak jenuh yang tinggi, karena setiap reaksi menghasilkan reaktif spesies oksigen (ROS) baru, rantai peroksidasi lipid ini berlanjut terus menerus (autokatalitik). Ros ini kemudian menghasilkan reaksi peroksidasi lipida baru yang menghancurkan seluruh membran plasma sel spermatozoa. Selama proses kriopreservasi, kualitas spermatozoa yang menurun dapat diantisipasi dengan penambahan antioksidan l-cysteine, selenium, dan kombinasinya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana penambahan antioksidan l-cysteine, selenium dan kombinasinya mempengaruhi kualitas spermatozoa selama kriopreservasi semen sapi PO.

Hasilnya diharapkan dapat memberikan informasi lebih lanjut tentang l-cysteine, selenium dan kombinasinya dalam kriopreservasi semen sapi PO serta dapat meningkatkan pengembangan ilmu di bidang kedokteran hewan khususnya pada bidang reproduksi ternak dalam upaya pemerintah untuk meningkatkan kualitas mutu genetik sapi PO di Indonesia.

## Materi dan Metode

Penelitian ini telah disetujui dan dinyatakan memenuhi persyaratan etik untuk penelitian menggunakan hewan oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah

Mada, Yogyakarta, dengan nomor: 0113/EC-FKH/Int./2022.

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Maret 2023 di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, Bandung Barat, Jawa Barat. Posisi lintang bujur -6.8215189399636555, 107.63006118650605. Pemeriksaan kualitas spermatozoa dilakukan di Laboratorium BIB Lembang dan Laboratorium Riset Terpadu Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan (FK-KMK) UGM.

Penelitian ini menggunakan lima ekor sapi PO jantan yang sehat yang dipelihara di BIB Lembang dan berusia antara 5 dan 10 tahun. Semen dikoleksi dengan menggunakan vagina buatan, hanya setidaknya 70% motilitas progresif sampel semen segar yang digunakan. Jumlah total 5 sampel semen ( 1 kali ejakulasi dari setiap sapi PO jantan) yang akan digunakan. Dibagi menjadi 4 bagian, setiap ejakulat diencerkan dengan pengencer A yang terdiri dari antibiotik buffer (susu skim dengan antibiotik streptomisin dan penicillin) dan kuning telur, dilanjutkan dengan pengencer B yang terdiri dari buffer antibiotik, kuning telur, glukosa dan gliserol pada suhu 37°C. Bagian 1 sebagai kontrol, bagian 2 ditambah 1 mM l-cysteine, bagian 3 ditambah 0,05 mM selenium, dan bagian 4 ditambah kombinasi 1 mM l-cystein + 0,05 mM selenium. Sampel semen selanjutnya di equilibrasi selama 2-3 jam pada suhu 4°C dan setelah itu dilakukan pemeriksaan motilitas *post equilibrasi*, hanya sampel setidaknya 55% motilitas progresif yang dibekukan. Semen dimasukkan kedalam straw dan dimasukkan kedalam container yang berisi nitrogen cair untuk dilakukan pembekuan, kemudian semen beku dicairkan kedalam waterbath beiri air suhu 37°C selama 30 detik untuk dilakukan proses pemeriksaan *post thawing*. Pemeriksaan semen beku meliputi motilitas spermatozoa, *recovery rate* dan viabilitas spermatozoa.

Data motilitas, *recovery rate*, dan viabilitas spermatozoa yang diperoleh disajikan dalam bentuk persentase, untuk menganalisis data penelitian,

*Statistical Product and Service Solution (SPSS)* versi 22.0 yang akan digunakan, dengan metode one-way Anova dan uji *post hoc Duncan Multiple Range*.

## Hasil dan Pembahasan

### Pemeriksaan Semen Segar

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Semen Segar Sapi PO

Karakteristik Semen	Rataan $\pm$ SEM
Volume Semen (ml)	5,45 $\pm$ 1,77
pH Semen	6,73 $\pm$ 0,17
Warna Semen	Putih Krem
Gerakan Massa	++
Motilitas Spermatozoa (%)	71 $\pm$ 2,23
Konsentrasi Spermatozoa ( $\times 10^9$ /ml)	0,98 $\pm$ 0,31

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa semen segar sapi PO adalah 71  $\pm$  2,23% dan masih dianggap baik dan selama tahap pengenceran. Hasil tersebut tersebut dilaporkan juga oleh Ax *et al.* (2000) bahwa motilitas spermatozoa normal adalah 70-90% dengan pergerakan cepat dan progresif, tetapi lebih rendah daripada hasil penelitian Umbu *et al.* (2021) dengan rata-rata motilitas 85,00  $\pm$  3,53%. Suhu dan kondisi cairan/plasma dapat mempengaruhi persentase motilitas spermatozoa. Suhu lingkungan yang rendah dapat menghambat motilitas, sedangkan suhu lingkungan yang tinggi dapat meningkatkan motilitas spermatozoa (Ismaya, 2014).

### Persentase Motilitas

Hasil persentase motilitas spermatozoa semen sapi PO *post thawing* pada berbagai perlakuan tersaji dalam Tabel 2. Persentase motilitas spermatozoa *post thawing* dengan penambahan l-cysteine (1 mM) dan selenium (0,05 mM) signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) berturut-turut pada nilai (48,00  $\pm$  2,73) dan (46,00  $\pm$  2,23) dibandingkan dengan kontrol (42,00  $\pm$  2,73) dan kombinasi l-cysteine 1 mM + selenium 0,05 mM (36,00  $\pm$  2,23), hal ini sama dengan Ansari *et al.* (2011) menunjukkan penambahan l-cysteine 1 mM dapat meningkatkan motilitas spermatozoa *post thawing* pada kriopreservasi semen sapi Sahiwal. Penambahan cysteine dalam pengencer semen dapat meningkatkan motilitas semen sapi melalui pengurangan stress oksidatif dengan menurunkan nilai ROS (*reactive oxygen species*) (Alvarez dan Storey, 1983), adanya ROS dalam kriopreservasi semen dianggap dapat merusak sistem membran plasma sehingga dapat menurunkan motilitas

spermatozoa (Bucak *et al.*, 2008). Penambahan selenium (0,05 mM) pada penelitian ini juga lebih baik dibandingkan kontrol dan kombinasi. Hasil tersebut juga dilaporkan oleh Dorotskar *et al.* (2012) yang menyatakan penambahan selenium pada kriopreservasi semen sapi dapat meningkatkan motilitas spermatozoa. Selenium adalah komponen enzim *glutathione peroxidase* yang dapat melindungi membran sel dan lipid yang mengandung organel dari kerusakan per-oksidatif dan di dalam kultur sel, selenium dalam bentuk selenite membantu sel untuk mendetoksifikasi dan melindungi dari kerusakan oksidatif (Zhang *et al.*, 2006)

Penambahan kombinasi l-cysteine (1 mM) + selenium (0,05 mM) menunjukkan signifikan ( $P < 0,05$ ) lebih rendah pada nilai (36,00  $\pm$  2,23) dibandingkan dengan kontrol (42,00  $\pm$  2,73). Adanya penambahan cysteine yang di kombinasikan selenium ke dalam pengencer dapat meningkatkan kadar molekul *endogenous glutathione* (GSH) yang mengandung banyak tiol di dalam sel, hal ini membuat nanopartikel selenium menggunakan *endogenous glutathione* (GSH) untuk menghasilkan ROS secara berlebih (Zhao *et al.*, 2020), dalam proses kriopreservasi, peroksidasi lipid dapat merusak membran sel spermatozoa jika terjadi ROS berlebih pada sperma, hal ini dapat menyebabkan penurunan morfologi, metabolisme sperma, motilitas, dan fertilitas (Insani *et al.*, 2014).

### Persentase *Recovery rate* Spermatozoa

Hasil persentase *Recovery rate* spermatozoa semen sapi PO *post thawing* pada berbagai perlakuan tersaji dalam Tabel 2. Persentase *recovery rate* spermatozoa dengan penambahan l-cysteine (1 mM) dan selenium (0,05 mM) signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) berturut-turut pada nilai (67,60  $\pm$  3,85) dan (64,78  $\pm$  3,14) dibandingkan dengan kontrol (59,15  $\pm$  3,86) dan kombinasi l-cysteine (1 mM) + selenium (0,05 mM) (50,69  $\pm$  3,14).

Penambahan antioksidan l-cysteine dan selenium memiliki persentase *recovery motility* yang lebih tinggi dibanding dengan kontrol dan kombinasi. Peningkatan ini nampaknya terkait dengan pemulihan yang cepat pada integritas membran dan permeabilitas dari aktivitas antioksidan enzimatik, dengan hal ini proses biosintesis dan penggunaan ATP menjadi lebih efisien di aksonema (Calamara *et al.*, 2010). Penambahan cysteine dan selenium meningkatkan motilitas spermatozoa individu dan melindungi struktur membran plasma mitokondria

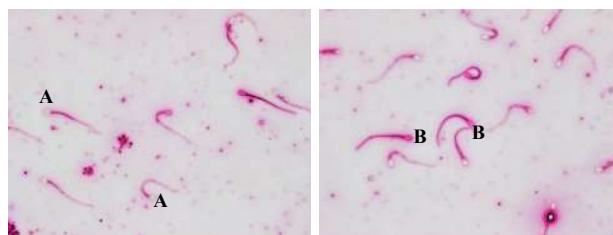
serta berperan dalam menghasilkan energi (Saieed *et al.*, 2019).

### Persentase Viabilitas

Metode pengecatan eosin negrosin digunakan untuk memeriksa viabilitas spermatozoa dalam semen sapi PO. Kepala spermatozoa hidup, yang tidak terwarnai akan berwarna putih, dan kepala spermatozoa yang mati akan berwarna merah, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Tabel 2 menunjukkan viabilitas spermatozoa sapi PO *post thawing*. Persentase viabilitas spermatozoa dengan penambahan antioksidan l-cysteine (1 mM) dan selenium (0,05 mM) signifikan lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) berturut-turut pada nilai ( $67,88 \pm 3,88$ ) dan ( $65,10 \pm 3,16$ ) dibandingkan dengan kontrol ( $59,35 \pm 3,90$ ) dan kombinasi l-cysteine (1 mM) + selenium (0,05 mM) ( $51,00 \pm 3,07$ ). Hasil dari Ansari *et al.* (2011) juga menunjukkan bahwa penambahan l-cysteine (1 mM) ke dalam pengencer dapat meningkatkan persentase viabilitas spermatozoa sapi Sahiwal, sedangkan hasil selenium juga sama dengan Dorotskar *et al.* (2012) yang menyatakan penambahan selenium pada kriopreservasi semen sapi dapat meningkatkan viabilitas spermatozoa. Penambahan selenium dalam pengencer selama proses kriopreservasi semen sapi dapat meningkatkan kemampuan membran plasma spermatozoa untuk mengurangi stres oksidatif (Dorotskar *et al.*, 2012).

Penambahan kombinasi l-cysteine (1 mM) + selenium (0,05 mM) menunjukkan signifikan ( $P < 0,05$ ) lebih rendah pada nilai ( $51,00 \pm 3,07$ ) dibandingkan dengan kontrol ( $59,35 \pm 3,90$ ). Adanya penambahan cysteine yang di kombinasikan selenium ke dalam pengencer dapat meningkatkan kadar molekul kecil *endogenous glutathione* (GSH) yang mengandung banyak tiol di dalam sel, hal ini membuat nanopartikel selenium menggunakan *endogenous glutathione* (GSH) untuk menghasilkan ROS secara berlebih (Zhao *et al.*, 2020). Peroksidasi lipid dapat menyebabkan perubahan fungsi

membran selama proses kriopreservasi, yang dapat menyebabkan kerusakan membran plasma sel spermatozoa, hal ini dapat menyebabkan penurunan motilitas, morfologi, fertilitas, dan metabolisme spermatozoa (Insani *et al.*, 2014).



Gambar 1. Hasil pemeriksaan viabilitas spermatozoa dengan metode pengecatan eosin negrosin adalah sebagai berikut: (A) spermatozoa hidup atau kepala tidak terwarnai (putih), atau (B) spermatozoa mati atau kepala terwarnai merah.

### Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa motilitas, recovery rate, dan viabilitas spermatozoa dapat ditingkatkan dengan menambah antioksidan l-cysteine dengan konsentrasi 1 mM dan selenium dengan konsentrasi 0,05 mM

### Ucapan Terima Kasih

Terima Kasih kepada Balai Inseminasi Buatan Lembang, Jawa Barat, Balai Inseminasi Buatan Pakem, Yogyakarta, Laboratorium Riset Terpadu FKMK UGM, Laboratorium Reproduksi FKH UGM, dan Laboratorium Fisiologi FKH UGM.

### Daftar Pustaka

- Adhyatma, M., Isnaini, N., & Nuryadi. (2013). Pengaruh bobot badan terhadap kualitas dan kuantitas semen sapi Simmental. *Jurnal Ternak Tropika*, 14(2), 53–62.
- Aisah, S., N. Isnaini dan S. Wahyuningsih. (2017). Kualitas Semen Segar dan *Recovery Rate* Sapi Bali Pada Musim Yang Berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 27(1):63-79.

Tabel 2. Motilitas, *Recovery rate*, dan Viabilitas spermatozoa (%) semen sapi PO *post thawing* pada berbagai perlakuan.

Perlakuan	<i>Post thawing</i>		
	Motilitas (%)	<i>Recovery rate</i> (%)	Viabilitas(%)
Kontrol	42,00 ± 2,73 <sup>a</sup>	59,15 ± 3,86 <sup>a</sup>	59,35 ± 3,90 <sup>a</sup>
L-cysteine (1 mM)	48,00 ± 2,73 <sup>c</sup>	67,60 ± 3,85 <sup>c</sup>	67,88 ± 3,88 <sup>c</sup>
Selenium (0,05 mM)	46,00 ± 2,23 <sup>c</sup>	64,78 ± 3,14 <sup>c</sup>	65,10 ± 3,16 <sup>c</sup>
L-cysteine (1 mM) + Selenium (0,05 mM)	36,00 ± 2,23 <sup>b</sup>	50,69 ± 3,14 <sup>b</sup>	51,00 ± 3,07 <sup>b</sup>

abc : perbedaan nyata ditemukan dengan beberapa superskip pada kolom yang sama ( $P < 0,05$ ).

- Akhter, S. Ansari, M. S. Rakha, B. A. Aziz, T. Murtaza, S. Andrabi, H. Ullah, N. Anwar, M. and Qayyum, M. (2015). Effect of Milk Based Extenders on Motility and Acrosomal Integrity of Buffalo Bull (*Bubalus bubalis*) Spermatozoa at 5°C. *Pakistan Journal Zoologi*, Vol. 47 (6), pp. 1645-1648.
- Alvarez JG, Storey BT. (1983). Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O<sub>2</sub> toxicity due to lipid peroxidation. *Biology Reproduction*. 28:1129–1136.
- Anonim. (2008). *Semen Beku – 1 Bagian Sapi*. SNI 4869.1:2008.
- Ansari, M. S. Rakha, B. A. and Akhter, S. (2011). Effect of L-cysteine in extender on post thaw quality of Sahiwal bull semen. *Animal Science Papers and Reports* vol. 29 (2011), no. 3, 197-203.
- Azzahra, F. Y., Setiatin, E. T., & Samsudewa, D. (2016). Evaluasi motilitas dan persentase hidup semen segar sapi PO Kebumen pejantan muda. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 11(2), 99–107.
- Ax, R.L, M.R. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C.Love, D.D Varner, B. Hafez &M.E. Bellin. (2000). *Semen Evaluation*. In *ESE Hafez (ed). Reproduction in Farm Animal, Ed ke-7*. Philadelphia (US): Lippincott Williams & Wilkins. 365-375.
- Bucak MN, Atessahin A, Yüce A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant Res*. 75:128–134.
- Calamera, J. C., Buffone, M. G., Doncel, G. F., Brugo-Olmedo, S., de Vincentiis, S., Calamera, M. M., Storey, B. T., & Alvarez, J. G. (2010). Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 93(3), 789–794. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.021>.
- Campbell, J.R, K.L Campbell & M.D. Kenealy. (2003). *Artificial Insemination: in Animal Sciences Ed ke-4*. Mc Graw-Hill, New York
- Dorostkar, K., Sayed M. Alavi-Shoushtari, Aram M. (2012). Effects of in vitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics before and after freezing in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Research Forum*. vol 3 (4) 263 – 268.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez, (2000). *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In: *Reproduction in Farm Animal*, Hafez, E.S.E. and B. Hafez (Eds.). 7th Edn., Lippincott and Williams, Baltimore, Maryland, USA., pp: 96-109.
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2016). Spermatozoa and Seminal Plasma. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds.), *Reproduction in Farm Animals* (pp.96–109). Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>.
- Gazali, M. dan Tambing, S. (2002). Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati. Maret 2002*, hlm. 27-32 Vol. 9, No. 1 ISSN 0854-8587.
- Hafez, E.S.E. (2004). X-and Y-Chromosome Bearing Spermatozoa. In *Reproduction in Farm Animal*. 8<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger Philadelphia. USA.
- Haris, F. Z., Ondho, Y. S., & Samsudewa, D. (2020). Effect of vitamine addition to frozen Simmental bull semen extender on post-thawing quality. *E3S Web of Conferences*, 142. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014202002>.
- Ina, A. T., & Kaka, A. (2020). Preservation of spermatozoa Sumba Ongole bulls using, citrate yolk diluent with the addition of palmyra palm juice. *Jurnal Ternak*, 11(2), 86–90.
- Insani, K., Sri R., Agung P., Aries S. (2014). Kadar MDA Spermatozoa Setelah Pembekuan. *Jurnal Biotropika*. 3 (2).
- Ismaya. (2014). *Bioteknologi inseminasi buatan pada sapi dan kerbau*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. ISBN: 979-420-848-5.
- Khan, I. M. Xu, D. Cao, Z. Liu, H. Khan, A. Rahman, S. U. Ahmed, J. Z. Raheem, M. A. and Zhang, Y. (2021). Addition of L-Cysteine and Vitamin E to Semen Diluent Enhances Freeze-thawed Spermatozoa Characteristics in Crossbred Cattle Bulls under Subtropical Environment. *Pakistan Journal Zoologi*. Pp 1-11. 2021.
- Komariah, Arifiantini, I. dan Nugraha, F. W. (2013). Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesian Holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan*. 37(3): 143 147.
- Muada, D. B., Paputungan, U., Hendrik, M. J., & Turangan, S. H. (2017). Karakteristik Semen

- Segar Sapi Bangsa Limousin Dan Simmental Di Balai Inseminasi Buatan Lembang. In *Zootek" Journal*. Vol. 37, Issue 2.
- Novianto, B.R. Sudarno, dan E.D. Masithah. (2014). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Gliserol dalam Susu Skim Kuning Telur untuk Proses Penyimpanan Sperma Beku terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 6 (1): 1-6.
- Pramanik, P.S. and Raina, V.S. (1998). Refrigerator (4-7°C) Preservation of Buffalo Semen in Various Extenders. *Indian J. Dairy Sci.*, **51**: 375-379.
- Safarinejad, M. R. and Safarijenad, S. (2009). Efficacy of Selenium and/or N-Acetyl Cysteine for Improving Semen Parameters in Infertile Men: A Double Blind, Placebo Controlled, Randomized Study. *The Journal of Urology*, Vol. 181, 741-751.
- Saieed, A. Y., Abdul-Ameer, N. A. H., & Mahmood, R. M. (2019). Effects of different concentrations of selenium and cysteine on the thawing of frozen awassi ram semen. *Biochemical and Cellular Archives*, *19*(2), 3025–3029.
- Saputra, D.J., M.N. Ihsan dan N. Isnaini. (2017). Korelasi Antar Lingkaran Skrotum Dengan Volume Semen, Konsentrasi dan Motilitas Spermatozoa Pejantan Sapi Bali. *Jurnal Ternak Tropika*. *8*(2):47-53.
- Sholikah, N., Isnaini, N., Puspita Anugra Yekti, A., & Susilawati, T. (2016). Pengaruh penggantian bovine serum albumin (BSA) dengan putih telur pada pengencer CEP-2 terhadap kualitas semen sapi Peranakan Ongole pada suhu penyimpanan 3-5 °C. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, *26*(1), 7-15.
- Solihati, N., Soeparna., Siti, D.R., Rangga, S., Annisaa, Y. (2020). Pengaruh Level Glutathione terhadap Kualitas Post-Thawing Semen Kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis* *7*(2):138-146.
- Sulistyowati, D., Faris, M. A., Yekti, A. P. A., Wahjuningsih, S., & Susilawati, T. (2018). Kualitas semen cair sapi Peranakan Ongole pada pengencer tris aminomethan kuning telur tanpa raffinosa yang disimpan pada media yang berbeda suhu. *Jurnal Ternak Tropika*, *19* (1), 38–45.
- Sundari, T. W., Tagama, T. R., & Maidaswar. (2013). Korelasi kadar pH semen segar dengan kualitas semen sapi Limousin di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Ilmiah Peternakan*, *1*(3), 1043-1049.
- Susilawati, T. (2011). *Spermatologi*. Universitas Brawijaya Press: Malang. 92.93, 96-97.
- Umbu, A., Lodu, J., Kaka, A., Sirappa, I. P., Program, S., Peternakan, F., Sains, D., Teknologi, K., Wira, W., & Sumba, J. R. (2021). Karakteristik dan Kualitas Semen Sapi Sumba Ongole dalam Pengencer BTS yang Dimodifikasi dengan Susu Kedelai (Characteristic and Quality of Sumba Ongole Bull Semen in BTS Dilution Modified with Soybean Milk). *Jurnal Sains Dan Teknologi Peternakan* *87113*(35).
- Viswanath R, Shannon P. (2000). Storage of Bovine Semen in Liquid Frozen State. *Anim Reprod Sci* *62*:23-53.
- Yatusholikhah, I. Isnaini, N. dan Ihsan, M. N. (2015). Pengaruh Penggunaan Pengencer *Skim Milk* Dengan Berbagai Level Filtrat Kecambah Kacang Hijau (*Phaseolus Radiates L.*) terhadap Kualitas Semen Cair Sapi Simmental Pada Suhu Ruang. *Jurnal Ternak Tropika* Vol. *16*, No.2: 07-15.
- Yekti, A. P. A., Tatulus, W. S. S., Ratnawati, D., Affandhy, L., Kuswati, Huda, A. N., & Susilawati, T. (2018). Kualitas dan kapasitas spermatozoa sapi Bali, Madura, dan Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Peternakan Tropis*, *5*(2), 34–41. <https://doi.org/10.33772/jitro.v5i2.4739>.
- Zhang J, Robinson D, Salmon P. (2006). A novel function for selenium in biological system: selenite as a highly effective iron carrier for Chinese hamster ovary cell growth and monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* *2006*; *95*:1188-119.
- Zhao, G., Dong, R., Teng, J., Yang, L., Liu, T., Wu, X., He, Y., Wang, Z., Pu, H., & Wang, Y. (2020). N-Acetyl- l -cysteine Enhances the Effect of Selenium Nanoparticles on Cancer Cytotoxicity by Increasing the Production of Selenium-Induced Reactive Oxygen Species. *ACS Omega*, *5*(20), 11710-11720. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01034>