

EVALUASI INTEGRITAS MEMBRAN PLASMA SEMEN CAIR BABI DALAM
PENGECER TRIS CITRAT FRUKTOSA

Hermilinda Parera¹, Victor Lenda², Yonas Lino³, Ryske Lusi⁴, Nathan Adoe⁵, Marten Bire⁶

⁽¹⁻⁶⁾, Politeknik Pertanian Negeri Kupang, Program Studi Kesehatan Hewan Jurusan Peternakan
Jl. Prof. Dr. Herman Yohanes Lasiana Kupang P.O.Box. 1152, Kupang 85011

Penulis Penyaji: hermilinda.parera@staff.politanikoe.ac.id

Penulis Koresponden: hermilinda.parera@staff.politanikoe.ac.id

ABSTRAK

Preservasi semen babi pada suhu dingin akan berdampak terhadap motilitas, viabilitas dan membran plasma spermatozoa babi (Kumaresan et al., 2009; Pinart et al., 2022). Standar Nasional Indonesia (SNI 8030:2014) menyebutkan minimal persentase motilitas semen yang layak digunakan dalam inseminasi buatan adalah sebesar 40%. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan selama 3 hari pada suhu 16-18°C terhadap motilitas, viabilitas, dan keutuhan membran plasma spermatozoa babi dalam pengencer tris citrat fruktosa (TCF). Penelitian ini menggunakan tiga ekor babi pejantan yang ditampung dua kali dalam seminggu. Rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima ulangan, yaitu lama penyimpanan 24 jam (L_{24}), 48 jam (L_{48}) dan 72 jam (L_{72}). Parameter yang diukur adalah motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma. Perbedaan antar perlakuan dianalisis dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama penyimpanan pada suhu 16-18 °C berpengaruh nyata ($P < 0.05$) terhadap penurunan persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma. Rataan persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma pada lama penyimpanan L_{24} adalah (85%, 88,80%, 94,83%), lama penyimpanan L_{48} (80%, 85,40%, 88,17%) dan lama penyimpanan L_{72} adalah (56%, 70,20%, dan 85%). Pengencer TCF yang digunakan pada semen babi yang dipreservasi selama tiga hari pada suhu 16-18°C masih memenuhi syarat untuk digunakan dalam produksi semen cair dalam inseminasi buatan. Disimpulkan bahwa pengencer TCF dapat digunakan sebagai pengencer semen babi yang dapat disimpan pada suhu 16-18 °C selama 3 hari.

Kata kunci: Membran plasma, Spermatozoa babi, Pengencer Tris citrat fruktosa.

PENDAHULUAN

Inseminasi Buatan (IB) pada ternak babi merupakan teknologi reproduksi dalam program pemuliaan. Program IB pada ternak babi di kota dan Kabupaten Kupang memiliki peran yang sangat penting terutama peningkatan populasi, dan mengontrol reproduksi pasca wabah *African Swine Fever* (ASF) tahun 2021. Saat wabah ASF mulai melanda sejak awal tahun 2022, mendorong masyarakat peternak baik skala menengah maupun kecil, khususnya di Kota Kupang dan kabupaten Kupang, mulai bangkit lagi untuk memenuhi kebutuhan masyarakat akan ternak babi, baik sebagai sumber protein maupun untuk keperluan upacara adat dan keagamaan, terlihat dari tingginya permintaan pelayanan IB oleh masyarakat (Parera & Lenda, 2023).

Faktor pendukung dalam optimalisasi program IB pada ternak babi adalah ketersediaan semen cair yang berkualitas dan memenuhi standar minimal SNI 803 tahun 2014. Kegiatan IB di kota Kupang dan kabupaten Kupang umumnya menggunakan semen segar atau semen hasil ejakulasi tanpa diberi pengencer sehingga menjadi suatu kendala berupa kelangkaan ketersediaan semen segar dan resiko penularan penyakit menggunakan semen segar. Ketersediaan semen cair yang berkualitas belum banyak di Kota dan Kabupaten Kupang dikarenakan pengencer komersial yang umum digunakan pada semen babi, seperti *Beltsville Thawing Solution* (BTS) dan *Semen Life*, susah diperoleh untuk penyedia bibit (produsen semen) skala kecil di kota Kupang dan kabupaten Kupang dan harganya relative lebih mahal

dengan waktu kadualarsa yang pendek.

Bahan pengencer yang digunakan untuk tujuan penyimpanan spermatozoa memegang peranan penting dalam upaya mempertahankan kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Sejumlah penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa pengencer *Tris citrat fructosa* (TCF) mampu mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa babi (Parera & Lenda, 2023). Adanya penambahan Bovine Serum Albumin (BSA) pada pengencer TCF juga menunjukkan bahwa berbagai komposisi asam amino yang terdapat dalam BSA mampu mensubstitusi penurunan konsentrasi berbagai bahan yang terdapat di dalam plasma semen akibat proses pengenceran, sehingga dapat menjaga stabilitas membran sel spermatozoa (Rachmawati et al., 2021)

Kualitas semen juga dapat dipertahankan jika tidak terjadi kerusakan terhadap integritas membran plasma spermatozoa (Wysokińska & Szablicka, 2021). Spermatozoa dapat kehilangan daya fertilitasnya tanpa harus kehilangan daya motilitasnya. Apabila spermatozoa mengalami kerusakan membran plasma maka spermatozoa masih dapat menunjukkan gerakan motil meskipun tidak mampu membuahi sel telur (Ansari et al., 2010; Buhr et al., 1994). Membran plasma berfungsi sebagai pelindung spermatozoa terhadap berbagai perubahan lingkungan, berfungsi dalam kapasitas dan menembus membran oosit, disamping itu sebagai unsur transport dari dalam sel ke luar sel atau sebaliknya bila membran plasma mengalami kerusakan maka proses ini tidak dapat berlangsung secara normal sehingga akan menurunkan kualitas spermatozoa. Membran plasma spermatozoa terdiri dari lipid, fosfolipid, glikolipid, kolesterol dan protein komposisi ini berpengaruh terhadap fungsi spermatozoa dan selama proses penyimpanan dan pendinginan dapat mempengaruhi integritas membran plasma spermatozoa (Gautier & Aurich, 2022).

Kerusakan integritas membran plasma spermatozoa berdampak pada proses kapasitas dan reaksi akrosom (Siregar et al., 2020). Akrosom merupakan ujung anterior terletak antara membran plasma dan bagian depan kepala spermatozoa dengan kandungan *acrosin*, *hyaluronidase*, dan beberapa enzim *hydrolytic* yang terlibat dalam proses fertilisasi (Georgadaki et al., 2016; Khawar et al., 2019)

Beberapa aspek yang perlu diperhatikan dalam pengenceran semen babi, selain motilitas maupun viabilitas adalah faktor fisiologis lain seperti integritas membran plasma atau membrane plasma utuh yang merupakan pelindung spermatozoa bagian luar juga keutuhan akrosom yang mengandung enzim yang berperan dalam menembus kumulus oophorus oosit pada saat fertilisasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan selama 3 hari pada suhu 16-18°C terhadap persentase; motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa babi dalam pengencer TCF.

METODE PENELITIAN

Materi

Alat penelitian berupa timbangan digital, aluminium foil, kertas saring (Whattman 150 mm)., kertas label, tisu, erlenmeyer (Pyrex) 100 mL, glass ukur (Pyrex), corong, *disposable syringe* (Onemed) ukuran 1 mL, 5 mL dan 10 mL, thermometer air, thermometer kulkas, lemari pendingin (Sanyo), tabung

reaksi, rak tabung reaksi, gelas objek, gelas penutup, Bunsen, pipet tetes, kamar hitung Neubauer, dan pipet eritrosit.

Bahan penelitian berupa Semen babi, Tris hydroxymethyl aminomethane, Citric acid monohydrate, D-Fructosa, Antibiotik, Aquabidest, bovine serum albumin, Larutan *hyposmotic swelling test* (HOST). Eosin 2%, Aquadest, Alkohol 70%.

Metode

Koleksi Sampel dan Pemeriksaan Semen Segar

Penelitian ini menggunakan semen dari 3 ekor babi pejantan umur 1,5- 2 tahun yang dikoleksi dua kali dalam seminggu. Sampel semen segar diperoleh dengan metode masase. Pasca koleksi, semen segera dibawa ke laboratorium Anatomi Patologi Politani Kupang untuk dilakukan evaluasi secara makroskopis dan mikroskopis, meliputi pemeriksaan volume (mL), warna, pH konsistensi, konsentrasi, gerakan massa, motilitas individu, dan viabilitas spermatozoa. Semen yang memenuhi syarat dilanjutkan pengenceran dan diberi perlakuan.

Pengenceran dan Perlakuan Semen

Semen yang memenuhi syarat diencerkan dengan bahan pengencer TCF dengan penambahan Bovine serum albumin hingga konsentrasi spermatozoa sebesar $250-300 \times 10^6/\text{mL}$, selanjutnya dibagi ke dalam kelompok perlakuan. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima ulangan, yaitu lama penyimpanan: 24 jam (L_{24}), 48 jam (L_{48}) dan 72 jam (L_{72}). Ketiga kelompok perlakuan ini disimpan selama tiga hari pada suhu $16-18^\circ\text{C}$. Evaluasi motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma dilakukan setiap hari selama perlakuan.

Pengamatan Motilitas dan Viabilitas

Motilitas spermatozoa adalah penilaian pergerakan spermatozoa yang bergerak progresif secara visual dengan mikroskop atau menggunakan sistem otomatis dengan bantuan komputer (computer assisted semen analysis/CASA) (Dominiek et al., 2011). Pemeriksaan motilitas spermatozoa dilakukan yaitu dilakukan dengan cara sebanyak satu tetes semen ditetaskan pada gelas objek yang kemudian ditutup dengan gelas penutup. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 kali dan 400 kali pada 10 lapang pandang. Penilaian diberikan dalam kisaran 0-100% (Priyanto et al., 2019).

Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa yang diketahui dengan mengamati jumlah spermatozoa hidup dan mati dengan pewarnaan eosin negrosin (Agarwal et al., 2016). Sebanyak satu tetes semen diletakkan pada gelas objek, ditambahkan pewarna Eosin 2%, dihomogenkan dan dibuat preparat apus dari campuran tersebut, selanjutnya apusan dikeringkan di atas api bunsen. Preparat diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran 400 kali. Sel spermatozoa yang mati akan berwarna merah (menyerap zat warna eosin), sedangkan sel spermatozoa yang masih hidup berwarna transparan (tidak menyerap warna) (Agarwal et al., 2016). Persentase viabilitas diperoleh dari jumlah sel spermatozoa hidup per jumlah keseluruhan spermatozoa dikali 100% (Kumaresan et al., 2020).

Pengamatan Integritas Membran Plasma Spermatozoa

Larutan HOST merupakan larutan yang dibuat dengan mencampurkan natrium sitrat dan fruktosa ke dalam aquades. 0,1 ml semen dimasukkan dalam tabung dan ditambahkan 0,9 ml larutan HOST, didiamkan selama 15 menit kemudian diteteskan pada ujung kaca objek dan dibuat apusan lalu diamkan hingga mengering. Preparat tersebut kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x. Persentase perhitungan integritas membran diperoleh dari jumlah sel spermatozoa yang memiliki membran utuh per jumlah keseluruhan sel spermatozoa yang diamati dikali 100% (Zubair et al., 2013). (Check et al., 2023) menambahkan bahwa membran spermatozoa utuh ditunjukkan dengan ekor sel spermatozoa yang menggulung, sedangkan sel yang tidak utuh ditunjukkan dengan ekor sel spermatozoa lurus.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan dan lima ulangan, yaitu lama penyimpanan 24 jam (L_{24}), 48 jam (L_{48}) dan 72 jam (L_{72}). Parameter yang diukur adalah motilitas, viabilitas dan keutuhan membran plasma. Evaluasi makroskopik dan mikroskopik semen segar dideskripsikan, sedangkan data persentase motilitas, viabilitas, integritas membran plasma dianalisis menggunakan sidik ragam atau ANOVA, bila terjadi perbedaan yang bermakna pada setiap perlakuan dilanjutkan dengan Uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Babi Dalam Pengencer TCF yang Dipreservasi Pada Suhu 16-18°C Selama Tiga Hari.

Motilitas spermatozoa adalah sel spermatozoa yang hidup dan bergerak maju progresif secara visual menggunakan bantuan mikroskop maupun analisis CASA (Dominiek et al., 2011; Muvhali et al., 2022; Ratnawati et al., 2019). Mitokondria berperan dalam motilitas spermatozoa, bila terjadi kerusakan mitokondria akibat perubahan suhu maka akan berpengaruh terhadap kemampuan pergerakan spermatozoa (Nesci et al., 2020). Hasil evaluasi rata-rata persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada pengencer TCF yang dipreservasi selama 3 hari pada suhu 16-18°C dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer TCF yang dipreservasi pada suhu 16-18°C selama Tiga Hari.

Lama penyimpanan (jam)	Peubah yang diamati (%)	
	Motilitas	Viabilitas
24	85±,707 ^c	88,80±1,304 ^c
48	80 ±1,581 ^b	85,40±1,517 ^b
72	56,40±1,673 ^a	77,20±1,304 ^a

Keterangan: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Hasil analisis ragam persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer TCF dalam penyimpanan pada suhu 16-18°C menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,05$) antara lama penyimpanan 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Selama penyimpanan 72 jam terdapat penurunan persentase motilitas dan viabilitas namun sampai pada hari ke tiga atau 72 jam persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa babi di atas 50% yaitu motilitas 56,40% dan Viabilitas 77,20%. Penurunan persentase motilitas spermatozoa selama proses penyimpanan pada suhu dingin menyebabkan penurunan komposisi lipid dan kandungan asam lemak tak jenuh sehingga berdampak pada kerusakan struktur, fungsi dan integritas membran dan berpengaruh terhadap penurunan motilitas (Am-in et al., 2011; Shan et al., 2021). Fruktosa merupakan sumber energi yang baik untuk spermatozoa babi karena jalur metabolisme yang lebih pendek yaitu fruktosa difosforilasi oleh heksokinase untuk menghasilkan fruktosa 6 fosfat. Spermatozoa membutuhkan energi metabolik untuk berbagai fungsi terutama untuk mendukung motilitas spermatozoa (Jones & Connor, 2000; Tsujii et al., 2006). Penurunan viabilitas spermatozoa babi disebabkan karena hilangnya motilitas, terganggunya aktivitas metabolisme sel, rusaknya membran plasma, sehingga penurunan viabilitas spermatozoa merupakan efek terakhir dari kerusakan spermatozoa (Lopez et al., 2017).

Integritas Membran Plasma Spermatozoa Babi dalam pengencer TCF yang dipreservasi pada suhu 16-18 °C selama 3 hari.

Evaluasi integritas membran spermatozoa dapat dilihat dari membran plasma utuh spermatozoa babi. Membran plasma utuh memegang peranan penting dalam metabolisme spermatozoa, reaksi akrosom dan penetrasi spermatozoa pada kumulus oophorus oosit sehingga kerusakan membran plasma utuh dapat digunakan sebagai salah satu indikator penyebab berkurangnya fungsi spermatozoa karena sedikitnya komponen seluler dan inaktivasi dari protein utama sehingga menurunkan fertilitas spermatozoa. Menurut (Přinosilová et al., 2014; Vazquez et al., 1997; Zubair et al., 2013), uji integritas membran spermatozoa babi dilakukan dengan metode HOST memberikan hasil yang akurat. Rataan persentase membran plasma utuh spermatozoa babi dalam pengencer TCF yang dipreservasi selama tiga hari pada suhu 16-18°C disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase membran plasma utuh spermatozoa babi dalam pengencer TCF yang dipreservasi pada suhu 16-18°C selama tiga hari.

Lama penyimpanan (jam)	Peubah yang diamati (%)
	Membran Plasma Utuh
24	94.83±1.722 ^c
48	88,17 ±1.47 ^b
72	85±0,894 ^a

Keterangan: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0.05$).

Hasil analisis menunjukkan semakin lama penyimpanan pada suhu 16-18°C berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap penurunan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa babi. Persentase membran plasma utuh pada hari ke-1 (satu) sebesar 94,83% dan pada hari ke-2 (dua) sebesar 88,17% (menurun 6,6 %) serta pada hari ke-3 (tiga) sebesar 85% (menurun 3,17%). Penurunan keutuhan membran plasma spermatozoa babi disebabkan semen babi yang sensitif atau tidak stabil selama proses pendinginan dikarenakan membran plasma spermatozoa memiliki komposisi kolesterol yang lebih sedikit dibandingkan fosfolipid dan distribusi kolesterol yang asimetris dalam membran plasma spermatozoa babi sehingga terjadi perubahan pada lapisan lipid yang berpengaruh terhadap gangguan permeabilitas membran plasma spermatozoa dan bertanggung jawab terhadap efek *cold shock* pada spermatozoa (Dominiek et al., 2011; Gautier & Aurich, 2022; Szymanowicz et al., 2019)

Penurunan persentase keutuhan membran plasma spermatozoa yang tidak drastis selama masa penyimpanan pada suhu 16-18 °C dikarenakan adanya penambahan BSA sebagai antioksidan dan krioprotektan pada pengencer TCF. Kandungan asam amino dan protein pada bovine serum albumin mampu mensubstitusi penurunan konsentrasi berbagai bahan yang terdapat di dalam plasma semen akibat proses pengenceran, sehingga dapat menjaga tekanan osmosis agar stabilitas membran sel spermatozoa tetap terjaga (Zhang et al., 2015).



Gambar 2. Membran Plasma Spermatozoa Babi: A) Utuh ekor melingkar
B) tidak utuh ekor lurus

Sel spermatozoa akan bereaksi ketika dimasukkan ke dalam larutan hipoosmotik, hal ini terjadi karena larutan hipoosmotik akan masuk ke dalam sel melewati membran plasma. Akibat perbedaan tekanan osmotik dari larutan tersebut dengan tekanan osmotik luar sel lebih tinggi, maka larutan tersebut akan masuk ke dalam sel dan menyebabkan kebengkakan. Fenomena lebih mudah teramati pada ekor spermatozoa sehingga dapat dihitung untuk mengetahui keutuhan membran plasma (Pérez-Llano et al., 2001; Zubair et al., 2013). Pembengkakan berperan penting untuk menggulung dan invaginasi, perubahan ekor dengan jelas kelihatan di bawah mikroskop spermatozoa menunjukkan pembengkakan atau reaksi HOST positif (Gambar 2A) yang menandakan membran spermatozoa utuh. Di sisi lain, membran spermatozoa yang fungsinya mengalami kerusakan tidak mengalami pembengkakan dan ekor

tidak terjadi invaginasi atau tidak menggulung (Gambar 2B) disebabkan rusaknya ultrastruktur biokimia dan fungsi membran.

Membran plasma merupakan lapisan semi permeabel yang menyelimuti sel spermatozoa untuk melindungi sel dari kerusakan mekanik maupun biokimia. Tris (hidroksi) aminomethan, fruktosa dan albumin dalam pengencer TCF berperan dalam menjaga keutuhan membran plasma spermatozoa. Tris sebagai *buffer* yang dapat mempertahankan keseimbangan osmotik dan bentuk normal dari spermatozoa. Tris dengan komposisi yang telah disesuaikan dengan kebutuhan dan fisiologis spermatozoa dapat melindungi membran plasma lebih lama dengan menahan perubahan konsentrasi ion hidronium dan ion hidroksi sehingga kelangsungan hidup dan fertilitas spermatozoa lebih tinggi membran plasma spermatozoa disusun oleh berbagai makromolekul seperti protein, glikoprotein, lipoprotein, asam lemak jenuh dan lainnya. Makromolekul ini berperan sebagai mengatur masuk dan keluarnya substrat dan elektrolit pada membran sel (Namula et al., 2019; Zhou et al., 2010).

Sumber utama produksi ATP berasal dari fosforilasi oksidatif mitokondrial dan glikolisis. Gula, dalam bentuk fruktosa, yang berasal dari pengencer dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam dua cara, yaitu diubah menjadi energi melalui proses glikolisis dan siklus Krebs, dan disimpan dalam bentuk glikogen sebagai cadangan saat sumber energi dalam pengencer telah habis. Spermatozoa babi sangat bergantung pada jalur glikolisis, tidak hanya untuk produksi ATP melalui fosforilasi oksidatif mitokondrial, tetapi juga untuk produksi laktat, yang merupakan sumber utama acetyl CoA. Spermatozoa babi terbukti mampu memanfaatkan laktat sebagai sumber energi yang diperlukan dalam motilitasnya untuk jangka waktu panjang. Fruktosa merupakan nutrisi penting bagi spermatozoa yang dimetabolisme dan diubah menjadi piruvat dan laktat. Kombinasi kandungan fruktosa dan glukosa dalam pengencer juga lebih efektif meningkatkan daya fertilisasi, dibandingkan dengan hanya glukosa (Tsujii et al., 2006).

KESIMPULAN

Lama penyimpanan semen dalam pengencer *tris citrat fruktosa* (TCF) selama 3 hari pada suhu 16-18°C berpengaruh nyata terhadap penurunan persentase motilitas, persentase viabilitas, dan persentase integritas membran plasma spermatozoa babi. Persentase motilitas, viabilitas dan integritas membran plasma spermatozoa babi pada hari ketiga berturut adalah 56%, 70,20%, dan 85%, dengan tingkat penurunan keutuhan membran plasma berkisar 3,17 - 6,6 %, walaupun demikian, pengencer TCF ini masih sangat layak digunakan sebagai pengencer semen karena dapat mempertahankan kualitas spermatozoa sesuai standar SNI 8030:2014 (motilitas >40%) selama tiga hari.

DAFTAR PUSTAKA

Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Eosin-Nigrosin Staining Procedure. In A. Agarwal, S. Gupta, & R. Sharma (Eds.), *Andrological Evaluation of Male Infertility: A Laboratory Guide* (pp. 73–77). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26797-5_8

- Am-in, N., Kirkwood, R. N., Techakumphu, M., & Tantasuparuk, W. (2011). Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*, 75(5), 897–903. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.032>
- Ansari, M. S., Allah Rakha, B., Ullah, N., Andrabi, S. M. H., Iqbal, S., Khalid, M., & Akhter, S. (2010). Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa Working at Semen Production Unit Qadirabad Sahiwal, Pakistan. View project Investigation of yak germplasm resources in the Hindu Kush H. *Animal Science Papers and Reports*, 28(3), 235–244. <https://www.researchgate.net/publication/279597445>
- Buhr, M. M., Curtis, E. F., & Kakuda, N. S. (1994). Composition and Behavior of Head Membrane Lipids of Fresh and Cryopreserved Boar Sperm. *Cryobiology*, 31(3), 224–238. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/cryo.1994.1028>
- Check, J. H., Check, D. L., & Bollendorf, A. (2023). Hypo-Osmotic Swelling Test and Male Factor. *Reproductive Medicine*, 4(2), 118–132. <https://doi.org/10.3390/reprodmed4020013>
- Dominiek, M., Alfonso, L. R., Tom, R., Philip, V., & Ann, V. S. (2011). Artificial Insemination in Pigs. In M. Manafi (Ed.), *Artificial Insemination in Farm Animals*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/16592>
- Gautier, C., & Aurich, C. (2022). “Fine feathers make fine birds” – The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106884>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). In *International Journal of Molecular Medicine* (Vol. 38, Issue 4, pp. 979–986). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Jones, A. R., & Connor, D. (2000). Fructose metabolism by mature boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility, and Development*, 12, 355–359. <https://doi.org/10.1071/RD00116>
- Khawar, M. B., Gao, H., & Li, W. (2019). Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 7). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00195>
- Kumaresan, A., Das Gupta, M., Datta, T. K., & Morrell, J. M. (2020). Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(June), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K. M., Bardoloi, R. K., Das, A., Kumar, S., & Naskar, S. (2009). Preservation of boar semen at 18°C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 110(1), 162–171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.006>
- Lopez, R. A., Van Soom, A., Arsenakis, I., & Maes, D. (2017). Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen. *Porcine Health Management*, 3, 15. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0062-5>

- Muvhali, P. T., Bonato, M., Malecki, I. A., & Cloete, S. W. P. (2022). Mass Sperm Motility Is Correlated to Sperm Motility as Measured by Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) Technology in Farmed Ostriches. *Animals*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/ani12091104>
- Namula, Z., Tanihara, F., Wittayarat, M., Hirata, M., Nguyen, N. T., Hirano, T., Le, Q. A., Nii, M., & Otoi, T. (2019). Effects of tris (hydroxymethyl) aminomethane on the quality of frozen-thawed boar spermatozoa. *Acta Veterinaria Hungarica*, 67(1), 106–114. <https://doi.org/10.1556/004.2019.012>
- Nesci, S., Spinaci, M., Galeati, G., Nerozzi, C., Pagliarani, A., Algieri, C., Tamanini, C., & Bucci, D. (2020). Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology*, 144, 82–88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.004>
- Parera, H., & Lenda, V. (2023). Evaluation of Motility, Viability and Abnormality of Boar Spermatozoa in Various Modified Extenders. *Jurnal Peternakan Ilmiah Terpadu*, 11(1), 13–33.
- Pérez-Llano, B., Lorenzo, J. L., Yenes, P., Trejo, A., & García-Casado, P. (2001). A short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology*, 56(3), 387–398. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00571-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00571-4)
- Pinart, E., Cenariu, M., Risopatrón, J., & Waberski, D. (2022). Temperature limits for storage of extended boar semen from the perspective of the sperm's energy status. *Journal Frontiers in Veterinary Science*, 1–12.
- Přinosilová, P., Kopecká, V., Hlavicová, J., & Kunetková, M. (2014). Modified hypoosmotic swelling test for the assessment of boar and bull sperm sensitivity to cryopreservation. *Acta Veterinaria Brno*, 83(4), 313–319. <https://doi.org/10.2754/avb201483040313>
- Priyanto, L., Budiyo, A., Kusumawati, A., & Kurniasih, K. (2019). Kerusakan Deoxyribonucleic Acid (DNA) Spermatozoa Memengaruhi Tingkat Kebuntingan Sapi Brahman (Damage To Deoxyribonucleic Acid (Dna) Spermatozoa Affecting The Level Of Pregnancy In Brahman Cattle). *Jurnal Veteriner*, 20(1), 119. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2019.20.1.119>
- Rachmawati, A., Ismaya, Widyobroto, B. P., Bintara, S., & Susilawati, T. (2021). Addition of bovine serum albumin (BSA) in cauda epididymal plasma-2 (CEP-2) extender to Ongole grade bull sperm motility and membrane integrity during the freezing process. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 788(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012132>
- Ratnawati, D., Isnaini, N., & Susilawati, T. (2019). Factors Affecting Spermatozoa Motility Analysis using CASA. *Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences*, 29(3), 145. <https://doi.org/10.14334/wartazoa.v29i3.2012>
- Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., & Brenig, B. (2021). Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168767>
- Siregar, A. F., Fahrudin, M., Wayan, N., Karja, K., & Prasetyaningtyas, W. E. (2020). *Quality of Chilled Ram Semen in Tris Egg Yolk Extender Added with Different Concentrations of Glutamine*.

- Szymanowicz, J., Schwarz, T., Murawski, M., Małopolska, M., Oszczeda, Z., Tuz, R., Nowicki, J., & Bartlewski, P. M. (2019). Storage of boar semen at 16-18 °C in the long-term commercial extender prepared with deionized water or nanowater. *Animal Reproduction*, 16(4), 864–870. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0023>
- Tsujii, H., Ohta, E., Miah, A. G., Hossain, S., & Salma, U. (2006). Effect of fructose on motility, acrosome reaction and in vitro fertilization capability of boar spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, 5(4), 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1447-0578.2006.00150.x>
- Vazquez, J. M., Martinez, E. A., Martinez, P., Garcia-Artiga, C., & Roca, J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47(4), 913–922. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00046-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00046-0)
- Wysokińska, A., & Szablicka, D. (2021). Integrity of sperm cell membrane in the semen of crossbred and purebred boars during storage at 17°C: Heterosis effects. *Animals*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ani11123373>
- Zhang, X.-G., Yan, G.-J., Hong, J.-Y., Su, Z.-Z., Yang, G.-S., Li, Q.-W., & Hu, J.-H. (2015). Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 50(2), 263–269. <https://doi.org/10.1111/rda.12481>
- Zhou, X., Xia, Y., & Huang, Y.-F. (2010). [Updated detection of the function of sperm plasma membrane]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, 16, 745–748.
- Zubair, M., Akbar Lodhi, L., Ahmad, E., Muhammad Associate professor Theriogenology, G., Muhammad Zubair, C., & Muhammad, G. (2013). Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. ~ 124 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 1(6), 124–128.