

# **STUDI PENGEMBANGAN PENGECER SEMEN SAPI BERBASIS NABATI MENGGUNAKAN NANO LIPOSOM DARI LESITIN KEDELAI**

**MUHAMMAD GUNAWAN**



**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU BIOMEDIS HEWAN  
PEMINATAN BIOLOGI REPRODUKSI  
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2026**

*@Hak cipta milik IPB University*

**IPB University**





## @Hak cipta milik IPB University

### Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “Studi Pengembangan Pengencer Semen Sapi Berbasis Nabati Menggunakan Nano Liposom dari Lesitin Kedelai” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2026

*Muhammad Gunawan*  
B3601222014



## RINGKASAN

MUHAMMAD GUNAWAN. Studi Pengembangan Pengencer Semen Sapi Berbasis Nabati Menggunakan Nano Liposom dari Lesitin Kedelai. Dibimbing oleh IIS ARIFIANI, NI WAYAN KURNIANI KARJA, MOHAMAD AGUS SETIADI dan SYAHRUDDIN SAID.

Pengencer semen berbasis lesitin dikenal memiliki sifat *anti-cold shock* dan telah dikembangkan dari berbagai sumber, seperti kuning telur, susu, kedelai dan liposom sintesis. Komponen-komponen ini membentuk lapisan pelindung di sekitar sel sperma, menstabilkan membran plasma dan mencegah pembentukan kristal es intraseluler selama pembekuan. Pengencer yang berasal dari kuning telur dan susu meskipun efektif, namun memiliki beberapa kekurangan. Protein yang berasal dari hewan membawa risiko mikrobiologis, seperti potensi penularan patogen, serta variabilitas biokimia yang menyulitkan standarisasi, dapat mengganggu metabolisme dan respirasi sperma, mengurangi motilitas, dan memengaruhi akurasi analisis semen.

Liposom untuk mengatasi keterbatasan tersebut, telah diperkenalkan sebagai pengencer alternatif selain pengencer konvensional yang berasal dari hewan. Liposom menguntungkan karena biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan sifatnya yang tidak beracun. Ukuran skala nano dan sifat amfifiliknya memungkinkan pembentukan spontan vesikel bilayer yang mampu mengkapsulasi dan mengirimkan senyawa bioaktif. Penerapan nanoteknologi dalam biologi reproduksi memanfaatkan karakter fisikokimia yang khas ini untuk meningkatkan kriopreservasi sperma.

Pengencer komersial berbasis liposom meskipun telah tersedia, namun masih impor. Pengembangan pengencer lesitin nabati yang terstandarisasi, seperti nanoliposom (NL) yang berasal dari kedelai, merupakan langkah penting untuk meningkatkan kualitas semen, keamanan bahan biologis, dan penyimpanan jangka panjang dalam program pembibitan ternak di Indonesia.

Penelitian ini terbagi beberapa tahap. Tahap pertama bertujuan untuk melakukan analisis partikel lesitin pada pengencer buatan sendiri dan komersial, menggunakan deteksi parameter pola pergerakan sistem *Computer Assisted Sperm Analyzer* (CASA) dan ukuran partikel pengencer dengan *Particle Size Analyzer* (PSA). Pengencer yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tris Kuning Telur (TKT), Andromed<sup>®</sup> (Minitube, Jerman), Bovifree<sup>®</sup> (Minitube, Jerman), OptiXcell<sup>®</sup> (IMV, Prancis), dan BioXcell<sup>®</sup> (IMV, Prancis). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer Tris kuning telur memiliki rentang ukuran partikel terluas, dari  $584,5 \pm 2,2$  nm hingga  $3255,7 \pm 48,84$  nm, ukuran partikel yang besar ini terdeteksi oleh sistem CASA. Pengencer komersial dengan ukuran partikel terkecil adalah OptiXcell<sup>®</sup> ( $64,6 \pm 2$  nm), diikuti oleh BioXcell<sup>®</sup> ( $186,2 \pm 2,2$  nm), Andromed<sup>®</sup> ( $245,7 \pm 2,8$  nm) dan Bovifree<sup>®</sup> ( $278,5 \pm 2,5$  nm), sehingga tidak terdeteksi oleh sistem CASA.

Penelitian kedua bertujuan untuk mengembangkan nanoliposom dari lesitin kedelai menggunakan proses sonikasi dan ultrasentrifugasi. Evaluasi ukuran, kestabilan dan keseragaman distribusi ukuran partikel nanoliposom dengan PSA. Pembuatan Nano Liposom (NL) menggunakan metode probe sonikasi dengan variasi interval waktu 15, 30 dan 45 menit. Partikel NL yang dioptimalkan pada

sonikasi selama 45 menit menunjukkan ukuran partikel rata-rata  $76 \pm 1,95$  nm dan kestabilan potensial zeta  $-43,2 \pm 0,25$  mV, yang mengkonfirmasi stabilitas elektrostatis yang tinggi dan dispersi koloid yang baik. Keceragaman distribusi ukuran partikel atau *Polydispersity Index* (PDI) sebesar  $0,399 \pm 0,020$  menunjukkan distribusi ukuran partikel cukup homogen dan stabil (*moderat monodisperse*). Penilaian morfologi pada partikel NL hasil sonikasi selama 45 menit menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan *High Resolution Electron Transmission Microscope* (HR-TEM) memperlihatkan adanya nanovesikel unilamellar berbentuk bulat yang mampu berinteraksi secara dinamis dengan membran sperma.

Penelitian ketiga bertujuan memformulasikan pengencer tris dengan nano liposom sebagai pengencer spermatozoa sapi. Perlakuan formulasi pengencer tris dengan konsentrasi nanoliposom 5, 10, 15, 20 dan 25 mg/mL, dengan parameter yang diamati pada nilai pH, osmolalitas, ukuran dan kestabilan partikel. Formulasi pengencer Tris Nano Liposom (TNL) pada konsentrasi 5-10 mg/mL mampu mempertahankan pH yang normal (6,5–7,5), osmolalitas yang normal (280–320 mOsmol/kg), ukuran partikel nano kurang dari 100 nm dan kestabilan partikel nano lebih kecil dari -30 mV. Nilai *Polydispersity Index* (PDI) sebesar 0,356-0,395 menunjukkan distribusi ukuran partikel cukup homogen dan stabil (*moderat monodisperse*). Pengencer TNL selama proses ekuilibrasi dan evaluasi setelah *thawing*, menunjukkan parameter motilitas total, motilitas progresif, viabilitas, dan kinematik sperma (*Velocity curved line* (VCL), *Velocity straight line* (VSL), *Velocity average path* (VAP), *Beat cross frequency* (BCF), dan *Amplitude of lateral head displacement* (ALH)) signifikan lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol TKT ( $P < 0,05$ ). Hasil *Scanning Electron Microscope* (SEM) mengkonfirmasi peningkatan integritas plasma membran dan berkurangnya kelainan pada morfologi dan topografi permukaan sperma yang dikriopreservasi menggunakan TNL. Formulasi TNL 10 mg/mL mampu melindungi akrosom, membran plasma, membran mitokondria dan berkurangnya fragmentasi DNA sperma, menunjukkan perlindungan yang lebih baik terhadap kerusakan akibat proses pembekuan dan *thawing*.

Penelitian keempat bertujuan mengevaluasi efektivitas pengencer TKT dan TNL 10 mg/mL dalam mempertahankan kualitas semen beku sapi bali setelah *thawing* dari uji coba produksi di BBIB Singosari dan BIBD Riau. Untuk meneliti hubungan antar parameter dan evaluasi perbedaan kelompok antar pengencer, dilakukan analisis korelasi, *Principal Component Analysis* (PCA) dan *Partial Least Squares–Discriminant Analysis* (PLS-DA). Kedua jenis pengencer mampu mempertahankan kualitas sperma setelah *thawing* dengan baik, tanpa perbedaan signifikan ( $P > 0,05$ ) pada motilitas total, viabilitas, integritas membran, integritas akrosom, dan fragmentasi DNA. Parameter kinematika juga tetap berada dalam kisaran optimal, yang menunjukkan bahwa pola gerak progresif dan kurvilinear tetap terjaga. Analisis multivariat (PCA dan PLS-DA) mengidentifikasi motilitas dan integritas membran sebagai kontributor utama variasi kualitas semen secara keseluruhan. Pengencer TNL menghasilkan respons yang lebih stabil dan homogen dibandingkan TKT. Pengencer TNL menunjukkan performa krioprotektif yang sebanding dengan pengencer TKT konvensional, sekaligus memberikan keunggulan tambahan berupa kejernihan, biosekuriti yang lebih baik, dan standarisasi komposisi. Karakteristik ini menonjolkan TNL sebagai alternatif yang layak dan berkelanjutan untuk kriopreservasi semen sapi serta mendukung



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

potensinya untuk penerapan yang lebih luas dalam program inseminasi buatan (IB).

Penelitian kelima bertujuan untuk mengetahui kualitas pengencer TNL 10 mg/mL dibandingkan dengan pengencer komersial yaitu: Andromed<sup>®</sup>, Bovifree<sup>®</sup> dan OptiXcell<sup>®</sup>. Hasil evaluasi kualitas semen setelah pembekuan diperoleh motilitas, progresif, kinematik dan keutuhan membran plasma berbeda nyata lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) pada pengencer TNL 10 mg/mL dibandingkan pengencer komersial. Pengencer TNL 10 mg/mL mampu mempertahankan kualitas semen setelah pembekuan dan dapat digunakan untuk program inseminasi buatan (IB).

Hasil penelitian menyimpulkan pengencer TNL 10 mg/mL menghasilkan respons yang lebih stabil dan homogen, menunjukkan performa krioprotektif yang sebanding dengan pengencer TKT. Keunggulan tambahan berupa kejernihan, biosekuriti yang lebih baik, dan standarisasi komposisi. Karakteristik dari TNL sebagai alternatif pengencer yang layak dan berkelanjutan untuk kriopreservasi semen sapi serta mendukung potensinya untuk penerapan yang lebih luas dalam program pembibitan ternak sapi di Indonesia.

Kata kunci: formulasi, kriopreservasi, nano liposom, pengencer, semen sapi

## SUMMARY

MUHAMMAD GUNAWAN. Development Study of Plant-Based Bovine Semen Extender Using Nano Liposomes from Soy Lecithin. Supervised by IIS ARIFIANTINI, NI WAYAN KURNIANI KARJA, MOHAMAD AGUS SETIADI, and SYAHRUDDIN SAID.

Lecithin-based semen extenders are known to have anti-cold shock properties and have been developed from various sources, such as egg yolk, milk, soy, and synthetic liposomes. These components form a protective layer around sperm cells, stabilize the plasma membrane, and prevent the formation of intracellular ice crystals during freezing. While extenders derived from egg yolk and milk are effective, they have several drawbacks. Proteins of animal origin carry microbiological risks, such as the potential transmission of pathogens, as well as biochemical variability that complicates standardization, may interfere with sperm metabolism and respiration, reduce motility, and affect the accuracy of semen analysis.

Liposomes have been introduced as an alternative extender to address these limitations, in addition to conventional animal-derived extenders. Liposomes are advantageous due to their biocompatibility, biodegradability, and non-toxic properties. Their nanoscale size and amphiphilic nature enable the spontaneous formation of bilayer vesicles capable of encapsulating and delivering bioactive compounds. The application of nanotechnology in reproductive biology leverages these unique physicochemical characteristics to enhance sperm cryopreservation.

Although commercial liposome-based extenders are available, they are still imported. The development of standardized plant-based lecithin extenders, such as nanoliposomes (NL) derived from soy, is an important step to improve semen quality, the safety of biological materials, and long-term storage in livestock breeding programs in Indonesia.

This study was divided into several stages. The first stage aimed to analyze lecithin particles in both homemade and commercial extenders, using Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) system motion pattern parameter detection and extender particle size measurement with a Particle Size Analyzer (PSA). The extenders used in this study were Tris egg yolk, Andromed® (Minitube, Germany), Bovifree® (Minitube, Germany), OptiXcell® (IMV, France), and BioXcell® (IMV, France). The results showed that the Tris egg yolk extender had the widest particle size range, from  $584,5 \pm 2,2$  nm to  $3255,7 \pm 48,84$  nm, with these large particles being detected by the CASA system. The commercial extender with the smallest particle size was OptiXcell® ( $64,6 \pm 2$  nm), followed by BioXcell® ( $186.2 \pm 2.2$  nm), Andromed® ( $245.7 \pm 2.8$  nm), and Bovifree® ( $278.5 \pm 2.5$  nm), so they were not detected by the CASA system.

The second study aimed to develop nanoliposomes from soybean lecithin using sonication and ultracentrifugation processes. Evaluation of the particle size and stability of nanoliposomes was conducted using a Particle Size Analyzer (PSA). Nano Liposome (NL) production utilized the probe sonication method with varying times of 15, 30, and 45 minutes. NL particles optimized by sonication for 45 minutes showed an average particle size of  $76 \pm 1.95$  nm and a zeta potential stability of  $-43.2 \pm 0.25$  mV, confirming high electrostatic stability and good



colloidal dispersion. The uniformity of particle size distribution or Polydispersity Index (PDI) of  $0.399 \pm 0.020$  indicates that the particle size distribution is fairly homogeneous and stable (moderate monodisperse). Morphological assessment of NL particles after 45 minutes of sonication using Scanning Electron Microscope (SEM) and High Resolution-Electron Transmission Microscope (HR-TEM) showed round unilamellar nanovesicles capable of dynamically interacting with the sperm membrane.

The third study aimed to formulate tris-based extender with nanoliposomes as a bull spermatozoa extender. The tris extender was formulated with nanoliposome concentrations of 5, 10, 15, 20, and 25 mg/mL, with parameters observed including pH, osmolality, particle size, and particle stability. The Tris Nanoliposome (TNL) extender formulated at 5–10 mg/mL was able to maintain stable pH (6.5–7.5) and osmolality (280–320 mOsmol/kg), a nanoparticle size less than 100 nm, and nanoparticle stability less than -30 mV. A Polydispersity Index (PDI) value of 0.356–0.395 indicates a fairly homogeneous and stable particle size distribution (moderately monodisperse). During equilibration and post-thaw evaluation, the TNL extender showed significantly higher values ( $P < 0.05$ ) for total motility, progressive motility, viability, and sperm kinematic parameters (Velocity curved line (VCL), Velocity straight line (VSL), Velocity average path (VAP), Beat cross frequency (BCF), and Amplitude of lateral head displacement (ALH)) compared to the TKT control. Scanning Electron Microscope (SEM) results confirmed increased plasma membrane integrity and reduced abnormalities in the morphology and surface topography of sperm cryopreserved using TNL. The TNL formulation at 10 mg/mL was able to protect the acrosome, plasma membrane, mitochondrial membrane, and reduce sperm DNA fragmentation, indicating improved protection against damage from the freezing and thawing process.

The fourth study aimed to evaluate the effectiveness of TKT and TNL 10 mg/mL extenders in maintaining the quality of frozen Bali bull semen after thawing from production trials at Singosari Artificial Insemination Center (AIC) and Riau Regional Artificial Insemination Center (RAIC). To investigate the relationships among parameters and group differentiation between extenders, correlation analysis, principal component analysis (PCA), and partial least squares–discriminant analysis (PLS-DA) were performed. Both types of extenders were able to maintain post-thaw sperm quality well, without significant differences ( $P > 0.05$ ) in total motility, viability, membrane integrity, acrosome integrity, and DNA fragmentation. Kinematic parameters also remained within optimal ranges, indicating that progressive and curvilinear motion patterns were maintained. Multivariate analysis (PCA and PLS-DA) identified motility and membrane integrity as the primary contributors to overall semen quality variation. The TNL extender produced a more stable and homogeneous response compared to TKT. The TNL extender demonstrated cryoprotective performance comparable to the conventional TKT extender, with additional advantages including clarity, better biosecurity, and standardized composition. These characteristics highlight TNL as a feasible and sustainable alternative for bull semen cryopreservation and support its potential for broader application in artificial insemination (AI) programs.

The fifth study aimed to determine the quality of TNL 10 mg/mL extender compared to commercial extenders: Andromed<sup>®</sup>, Bovifree<sup>®</sup>, and OptiXcell<sup>®</sup>. Evaluation results of post-freezing semen quality showed that motility, progressive



motility, kinetics, and plasma membrane integrity were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in the TNL 10 mg/mL extender compared to commercial extenders. The TNL 10 mg/mL extender was able to maintain semen quality after freezing and can be used for artificial insemination (AI) programs.

The research results concluded that the TNL 10 mg/mL extender produced a more stable and homogeneous response, demonstrating cryoprotective performance comparable to the TKT extender. Additional advantages include clarity, better biosecurity, and standardized composition. These characteristics make TNL a viable and sustainable alternative extender for bull semen cryopreservation and support its potential for broader application in cattle breeding programs in Indonesia.

**Keywords:** bull semen, cryopreservation, extender, formulation, nanoliposome



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**© Hak Cipta milik IPB, tahun 2026**  
**Hak Cipta dilindungi Undang-Undang**

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.*

# **STUDI PENGEMBANGAN PENGENCER SEMEN SAPI BERBASIS NABATI MENGGUNAKAN NANO LIPOSOM DARI LESITIN KEDELAI**

**MUHAMMAD GUNAWAN**

Disertasi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Doktor pada  
Program Studi Ilmu Biomedis Hewan

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU BIOMEDIS HEWAN  
PEMINATAN BIOLOGI REPRODUKSI  
SEKOLAH KEDOKTERAN HEWAN DAN BIOMEDIS  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2026**

*@Hak cipta milik IPB University*

**IPB University**





@Hak cipta milik IPB University

IPB University



IPB University  
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

1. Prof. Dr. drh. Bambang Purwantara, M.Sc
2. Dr. drh. Mokhamad Fahrudin

Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

1. Prof. Dr. drh. Bambang Purwantara, M.Sc
2. Dr. drh. Akbar, MP.



Judul Disertasi: Studi Pengembangan Pengencer Semen Sapi Berbasis Nabati  
Menggunakan Nano Liposom dari Lesitin Kedelai

Nama : Muhammad Gunawan

NIM : B3601222014

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Prof. Dr. Dra. R. Iis Arifiantini, M.Si.

Pembimbing 2:

Prof. drh. Ni Wayan Kurniani Karja, M.P. Ph.D.

Pembimbing 3:

Prof. Dr. drh. Mohamad Agus Setiadi

Pembimbing 4:

Prof. Dr. Ir. Syahrudin Said, M.Agr.Sc.



TT ELEKTRONIK

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Dr. Drh. Chaerul Basri, M. Epid.

NIP. 19770525 200501 1 002

Dekan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis

Prof. drh. Amrozi, Ph.D.

NIP. 19700721 199512 1 001

Tanggal Ujian Tertutup : 9 Juli 2026

Tanggal Sidang Promosi: 5 Agustus 2026

Tanggal Lulus:



## @Hak cipta milik IPB University

### Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Judul disertasi ini, “Studi Pengembangan Pengencer Semen Sapi Berbasis Nabati Menggunakan Nano Liposom dari Lesitin Kedelai”, diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Doktor Ilmu Biomedis Hewan, Peminatan Biologi Reproduksi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, Institut Pertanian Bogor.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada para pembimbing, Prof. Dr. Dra. R. Iis Arifiantini, M.Si, Prof. drh. Ni Wayan Kurniani Karja, M.P. Ph.D, Prof. Dr. drh. Mohamad Agus Setiadi dan Prof. Dr. Ir. Syahrudin Said, M.Agr.Sc selaku pembimbing yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan pembimbingan, saran dan nasihat pada penulis dalam menyusun disertasi ini. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada promotor luar komisi, Prof. Dr. drh. Bambang Purwantara, M.Sc, Dr. drh. Mokhamad Fahrudin dan Dr. drh. Akbar M.P atas komentar dan masukannya dalam penyempurnaan naskah disertasi ini.

Ucapan terima kasih kepada Institut Pertanian Bogor, Dekan Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis Bapak Prof. Dr. drh. Amrozi, Pimpinan Program Studi Ilmu Biomedis Hewan Bapak Dr. drh. Chaerul Bhasri, M.Epid. dan seluruh staf Program Studi Ilmu Biomedis Hewan pada umumnya dan Peminatan Biologi Reproduksi pada khususnya, dalam memberikan pelayanan terbaiknya.

Ucapan terima kasih kepada Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Malang, Bapak Dr. drh. Akbar M.P selaku Kepala Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari dan seluruh staf Laboratorium Produksi Semen Beku, dalam penelitian ujicoba produksi semen beku menggunakan pengencer Tris Nano Liposom.

Ucapan terima kasih kepada Balai Inseminasi Buatan Daerah Provinsi Riau, Bapak M. Syam, S.Pt selaku Kepala Balai Inseminasi Buatan Daerah Riau dan Bapak Dedi Junian, S.Pt serta seluruh staf Laboratorium Produksi Semen Beku, dalam penelitian ujicoba produksi semen beku menggunakan pengencer Tris Nano Liposom.

Ucapan terima kasih kepada Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) atas beasiswa *Degree by Research* (DBR) dalam pembiayaan pendidikan dan bantuan penelitian selama menempuh perkuliahan di Pascasarjana IPB. Terima kasih kepada Pendanaan Penelitian Rumah Program tahun 2024-2025, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan dan E-Layanan Sain BRIN (Elsa-BRIN) dalam pendanaan dan layanan analisis penelitian.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada keluarga besar sivitas Pusat Riset Zoologi Terapan BRIN terutama Kepala Pusat Riset Zoologi Terapan dan kelompok riset Repronmik Hewan yaitu Dr. Dra. Ekayanti M Kaiin, M.Si, Dr. Tulus Maulana, S.Pt, M.Si, Partogi Paskah Agung, S.Pt, M.Si, Edy Sophian, S.Pt, M.Si, drh. Nina Herlina, M.Si dan Dr. Hikmayani Iskandar, S.Pt.

Ucapan terima kasih kepada teman-teman Program Studi Doktor Ilmu Biomedis Hewan angkatan 2022 (Dr. Dwi Untari, Dr. Shalina, Dr. Dian, Dr. Rahma, Dr. Asmi, Dr. Ika, Dr. Mahfud, (Kandidat Doktor) Mbak Ria Ceria dan Mbak Hastuti) atas pertemanan dan motivasinya.

Pencapaian ini secara khusus penulis sampaikan terima kasih kepada istri tercinta Listyaning Handayani, S.Pd, S.Pd.SD, dan kedua buah hati tercinta Fadhil



Al Khairiy dan Hasna Fakhira atas semua doa, kesabaran, pengertian, kasih sayang dan motivasinya.

Ungkapan terima kasih dan doa penulis sampaikan kepada ayahanda Alm. Soemono dan ibunda Alm. Siti Suparti serta ibu Zairoh, kedua mertua ayahanda Alm. Joko Mursito dan Alm. ibunda Sri Sudarsih, Om Sukiyo dan Bulik Tri Sudaryanti, Om Heru Kiswanto dan Bulik Nurfa, Alm. Mas Eko Timbul Pramono dan Mbak Uning, Mas Tri Suryono dan Mbak Nani, Mas Dwi Maktal Suseno dan Mbak Puji, keluarga besar Mbah Joyo Pawiro (di Yogyakarta) dan Mbah Panggih-Sudarmi. (di Klaten dan Bogor).

Permohonan maaf penulis sampaikan atas segala kekurangan dalam penyusunan disertasi ini. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan serta Balai Inseminasi Buatan di Indonesia.

Cibinong, Agustus 2026

*Muhammad Gunawan*

## DAFTAR ISI

|                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DAFTAR TABEL                                                                                                                                           | xix |
| DAFTAR GAMBAR                                                                                                                                          | xix |
| I PENDAHULUAN                                                                                                                                          | 1   |
| 1.1 Latar Belakang                                                                                                                                     | 1   |
| 1.2 Rumusan Masalah                                                                                                                                    | 2   |
| 1.3 Tujuan Penelitian                                                                                                                                  | 3   |
| 1.4 Manfaat Penelitian                                                                                                                                 | 3   |
| 1.5 Ruang Lingkup Penelitian                                                                                                                           | 3   |
| 1.6 Kebaruan/Novelty                                                                                                                                   | 4   |
| 1.7 Prosedur Penelitian                                                                                                                                | 5   |
| II PERBANDINGAN UKURAN PARTIKEL PENGECER KOMERSIAL DAN PENGECER BUATAN SENDIRI                                                                         | 6   |
| Abstrak                                                                                                                                                | 6   |
| Abstract                                                                                                                                               | 6   |
| 2.1 Pendahuluan                                                                                                                                        | 6   |
| 2.2 Metode Penelitian                                                                                                                                  | 7   |
| 2.3 Hasil dan Pembahasan                                                                                                                               | 8   |
| 2.4 Simpulan                                                                                                                                           | 10  |
| III PENGEMBANGAN NANOLIPOSOM DARI LESITIN KEDELAI DENGAN METODE SONIKASI DAN ULTRASENTRIFUGASI                                                         | 11  |
| Abstrak                                                                                                                                                | 11  |
| Abstract                                                                                                                                               | 11  |
| 3.1 Pendahuluan                                                                                                                                        | 11  |
| 3.2 Metode Penelitian                                                                                                                                  | 12  |
| 3.3 Hasil dan Pembahasan                                                                                                                               | 14  |
| 3.4 Simpulan                                                                                                                                           | 15  |
| IV PENGEMBANGAN FORMULASI PENGECER TRIS NANOLIPOSOM SEBAGAI ALTERNATIF PENGANTI PENGECER KUNING TELUR UNTUK KRIOPRESERVASI SEMEN SAPI PERANAKAN ONGOLE | 16  |
| Abstrak                                                                                                                                                | 16  |
| Abstract                                                                                                                                               | 16  |
| 4.1 Pendahuluan                                                                                                                                        | 17  |
| 4.2 Metode Penelitian                                                                                                                                  | 19  |
| 4.3 Hasil dan Pembahasan                                                                                                                               | 24  |
| 4.4 Simpulan                                                                                                                                           | 32  |
| V PENINGKATAN KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI ( <i>Bos sondaicus</i> ) MENGGUNAKAN PENGECER TRIS-NANO-LIPOSOM                                            | 33  |
| Abstrak                                                                                                                                                | 33  |
| Abstract                                                                                                                                               | 33  |
| 5.1 Pendahuluan                                                                                                                                        | 34  |
| 5.2 Metode Penelitian                                                                                                                                  | 35  |
| 5.3 Hasil dan Pembahasan                                                                                                                               | 38  |
| 5.4 Simpulan                                                                                                                                           | 45  |



|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| VI PERBANDINGAN KUALITAS SEMEN BEKU DALAM<br>PENGECER TRIS NANOLIPOSOM<br>PENGECER KOMERSIAL | 46 |
| Abstrak                                                                                      | 46 |
| Abstract                                                                                     | 46 |
| 6.1 Pendahuluan                                                                              | 47 |
| 6.2 Metode Penelitian                                                                        | 48 |
| 6.3 Hasil dan Pembahasan                                                                     | 49 |
| 6.4 Simpulan                                                                                 | 51 |
| VII PEMBAHASAN UMUM                                                                          | 52 |
| VIII SIMPULAN UMUM DAN SARAN                                                                 | 54 |
| 8.1 Simpulan Umum                                                                            | 54 |
| 8.2 Saran                                                                                    | 54 |
| DAFTAR PUSTAKA                                                                               | 55 |
| RIWAYAT HIDUP                                                                                | 64 |

## DAFTAR TABEL

|     |                                                                                |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 | Ukuran partikel dan potensi zeta NL berdasarkan <i>particle size analyzer</i>  | 14 |
| 4.1 | Komposisi pengencer semen berbasis tris                                        | 20 |
| 4.2 | Nilai keasaman dan osmolalitas dari formulasi pengencer                        | 24 |
| 4.3 | Hasil pengukuran PSA dan ZP pada pengencer TNL                                 | 25 |
| 4.4 | Kualitas makroskopis dan mikroskopis semen segar                               | 26 |
| 4.5 | Kualitas semen sapi dalam pengencer TNL setelah ekuilibrasi                    | 27 |
| 4.6 | Kualitas semen beku sapi Ongole dalam pengencer TNL setelah thawing            | 29 |
| 5.1 | Kualitas makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi bali dari BBIB Singosari | 39 |
| 5.2 | Kualitas makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi bali dari BIBD Riau      | 39 |
| 5.3 | Kualitas semen beku sapi bali setelah thawing dalam pengencer TKT dan TNL      | 40 |
| 5.4 | Kinematika semen beku sapi bali setelah thawing dalam pengencer TKT dan TNL    | 41 |
| 6.1 | Kualitas makroskopis dan mikroskopis semen segar                               | 49 |
| 6.2 | Kualitas semen beku setelah pembekuan menggunakan pengencer TNL dan komersial  | 50 |

## DAFTAR GAMBAR

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1 | Bagan alur penelitian                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 5  |
| 2.1 | Evaluasi ukuran partikel pengencer komersial menggunakan CASA                                                                                                                                                                                                                                                   | 8  |
| 2.2 | Gambaran ukuran partikel pengencer TKT menggunakan CASA                                                                                                                                                                                                                                                         | 9  |
| 2.3 | Hasil PSA dari pengencer buatan sendiri dan komersial                                                                                                                                                                                                                                                           | 9  |
| 3.1 | (a) Morfologi nanoliposom diamati menggunakan SEM pada pembesaran 100.000x, dan (b) Struktur nanoliposom diamati menggunakan HR-TEM pada pembesaran 36.000x, pengenceran 50x.                                                                                                                                   | 15 |
| 4.1 | (a) Morfologi spermatozoa setelah thawing menggunakan pengencer TNL, diamati dengan SEM pada pembesaran 3.500x. (b) Morfologi spermatozoa setelah thawing menggunakan pengencer TKT diamati dengan SEM pada pembesaran 1500×                                                                                    | 30 |
| 5.1 | Pembesaran 400x, mikroskop fluoresensi, Imager Z2, Carl Zeiss, Jerman. A. Integritas akrosom. (a) Akrosom utuh (fluoresensi hijau pada akrosom), (b) Akrosom tidak utuh (fluoresensi merah pada akrosom). B. Integritas DNA. (a) DNA utuh (halo kecil atau tidak ada halo), (b) DNA terfragmentasi (halo besar) | 38 |
| 5.2 | Visualisasi heatmap korelasi Pearson terhadap kualitas sperma, (a) menggunakan pengencer TKT, dan (b) menggunakan pengencer TNL                                                                                                                                                                                 | 42 |
| 5.3 | a) Analisis <i>Principal Component Analysis</i> (PCA) dan b) <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> (PLS-DA) pada pengencer TKT (pink) dan pengencer TNL (hijau)                                                                                                                                    | 44 |



## @Hak cipta milik IPB University

### Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.