

# Pengaruh Perbedaan Waktu Ekuilibrasi Sebelum Pembekuan Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Rambon Banyuwangi Menggunakan Pengencer Tris Kuning Telur

*The Effect of Different Equilibration Time Before Freezing on Spermatozoa Quality of Banyuwangi Rambon Bull Using Yolk Tris Diluter*

Firman Setyawan<sup>1\*</sup>, Tri Wahyu Suprayogi<sup>2</sup>, Ragil Angga Prastiya<sup>2</sup>, Tjuk Imam Restiadi<sup>2</sup>, Amung Logam Saputro<sup>3</sup>, Bodhi Agustono<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bachelor of Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Department of Veterinary Reproduction, <sup>3</sup>Department of Clinic and Animal Hospital, <sup>4</sup>Department of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, UNAIR C- Campus Mulyorejo, Surabaya, East Java, Indonesia 60115  
Telp. (031)5993016, Fax. (031)5993015

\*Corresponding author: [firman.setyawan-2015@fkh.unair.ac.id](mailto:firman.setyawan-2015@fkh.unair.ac.id)

## Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan waktu ekuilibrasi 2 jam, 3 jam, 4 jam dan 5 jam terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa Sapi Rambon sebelum pembekuan. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan yaitu waktu ekuilibrasi P1 (2 jam), P2 (3 jam), P3 (4 jam) dan P4 (5 jam), satu ekor pejantan sapi rambon, dan lima kali pengulangan. Hasil analisis statistik Anova satu arah dan dilanjut uji Duncan mendapatkan hasil motilitas (P1)  $76.00 \pm 2.2/3$ ; (P2)  $73.00 \pm 2.7/3$ ; (P3)  $67.00 \pm 2.7/3$ ; dan (P4)  $52.00 \pm 2.7/2$ . Hasil viabilitas (P1)  $86.00 \pm 1.41$ ; (P2)  $78.00 \pm 2.73$ ; (P3)  $72.00 \pm 5.70$  dan (P4)  $57.00 \pm 2.73$ . Hasil abnormalitas (P1)  $3.7 \pm 0.75$ ; (P2)  $3.8 \pm 0.75$ ; (P3)  $4.4 \pm 1.08$  dan (P4)  $5.2 \pm 0.57$ . Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan hasil yang berbeda nyata ( $p < 0.05$ ) antara waktu ekuilibrasi dengan kualitas spermatozoa Sapi Rambon sebelum pembekuan dan hasil dari penelitian ini menunjukkan persentase motilitas tertinggi terdapat pada waktu ekuilibrasi 2 jam, persentase viabilitas tertinggi terdapat pada waktu ekuilibrasi 2 jam dan persentase abnormalitas terendah terdapat pada waktu ekuilibrasi 2 jam.

Kata kunci: ekuilibrasi, Sapi Rambon, sebelum pembekuan, kualitas spermatozoa

## Abstract

The aim of this study was to determine the effect of different equilibration time on motility, viability, and abnormalities of Rambon bull's spermatozoa before freezing. This study used a completely randomized design with four treatments, they are equilibration time P1 (2 hours), P2 (3 hours), P3 (4 hours) and P4 (5 hours), and five repetitions. The results of motilities using One Way Anova statistical analysis continued by Duncan Test were (P1)  $76.00 \pm 2.2/3$ ; (P2)  $73.00 \pm 2.7/3$ ; (P3)  $67.0 \pm 2.7/3$  and (P4)  $52.00 \pm 2.7/2$ . The result of viabilities were (P1)  $86.00 \pm 1.41$ ; (P2)  $78.00 \pm 2.73$ ; (P3)  $72.00 \pm 5.70$  and (P4)  $57.00 \pm 2.73$  while the result of abnormalities were (P1)  $3.7 \pm 0.75$ ; (P2)  $3.8 \pm 0.75$ ; (P3)  $4.4 \pm 1.08$  and (P4)  $5.2 \pm 0.57$ . The conclusion of this study showed that the results were significantly different ( $p < 0.05$ ) between the equilibration time and the quality of the Rambon bull spermatozoa before freezing. The highest percentage of motility and viability was at the 2 hour equilibration time whereas the lowest percentage of abnormalities was at the 2 hour equilibration time.

Key words: before freezing, equilibration, Rambon bull, spermatozoa quality

Received: 13 April 2019

Revised: 16 Mei 2019

Accepted: 14 Juli 2019

## PENDAHULUAN

Sapi Rambon merupakan sapi lokal yang banyak dikembangkan masyarakat Kecamatan Glagah Kabupaten Banyuwangi yang berpotensi

sebagai penghasil daging sekaligus sebagai plasma nutfah dan juga memiliki potensial ekonomi bagi rumah tangga (Nugroho dkk., 2013). Jumlah populasi sapi Rambon jantan di Kecamatan Glagah mengalami penurunan dari

115 ekor pada tahun 2017 menjadi 95 ekor pejantan pada tahun 2018 (Disper Banyuwangi 2017, Disper Banyuwangi 2018). Penurunan jumlah populasi pejantan dapat menyebabkan penurunan kualitas dan terancam mengalami kepunahan. Upaya yang dapat melestarikan sapi Rambon yaitu dengan cara pengolahan semen sapi Rambon dengan pemanfaatan salah satu teknologi reproduksi Inseminasi Buatan (Zulyazaini dkk., 2016).

Aplikasi Inseminasi Buatan pada sapi Rambon masih menemukan banyak kendala, terutama belum adanya penyediaan semen beku sapi Rambon dan belum ditemukannya metode pembekuan yang tepat untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa setelah pembekuan. Proses pembuatan semen beku terdapat berbagai tahapan, diantaranya gliserolisasi, ekuilibrase, filling, sealing, pre freezing dan freezing (Aila, 2016). Menurut Toelihere yang dikutip oleh Apriyanti (2012) waktu ekuilibrase adalah waktu yang dibutuhkan spermatozoa sebelum proses pembekuan untuk penyesuaian dengan pengencer supaya disaat proses pembekuan tingkat kematian spermatozoa tidak berlebihan dan dapat dicegah.

Berdasarkan latar belakang diatas, perlu dilakukan penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan waktu ekuilibrase sebelum pembekuan terhadap kualitas spermatozoa sapi Rambon.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Desa Kemiren Kecamatan Glagah Kabupaten Banyuwangi. Penampungan semen dilakukan dirumah salah satu peternak dengan menggunakan vagina buatan. Pemeriksaan kualitas spermatozoa sapi Rambon dilakukan di Laboratorium Instrumen PSDKU Universitas Airlangga di Banyuwangi. Sampel penelitian ini adalah satu ekor pejantan sapi Rambon berumur 5 tahun

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 5 kali pengambilan. Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dan selanjutnya dievaluasi kualitasnya secara makroskopis dan

mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, pH, bau dan konsistensi. Pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi. Semen yang memenuhi syarat langsung diencerkan menggunakan tris kuning telur dan selanjutnya dilakukan proses ekuilibrase sesuai dengan perlakuan. Perlakuan 1 ekuilibrase selama 2 jam, perlakuan 2 ekuilibrase selama 3 jam, perlakuan 3 ekuilibrase selama 4 jam dan perlakuan 4 ekuilibrase selama 5 jam. Pengumpulan data dilakukan setiap tahap evaluasi kualitas spermatozoa. Data yang di peroleh yaitu motilitas, viabilitas dan abnormalitas.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil semen segar sapi Rambon Banyuwangi setelah penelitian dapat dilipat pada Tabel 1. Semen sapi Rambon berwarna putih dan berbau khas sapi. Warna semen pada masing-masing bangsa berbeda, semen sapi pada umumnya berwarna putih kekuning-kuningan atau putih susu (Kartasudjana, 2001).

Konsistensi semen sapi Rambon yang diperoleh pada penelitian ini adalah kental. Hasil ini sesuai dengan penelitian sapi Madura dengan konsistensi sedang-kental (Ratnawati dkk., 2017), sapi Bali dengan konsistensi kental (Savitri dkk., 2014). Semen yang baik memiliki derajat konsistensi yang kental melebihi kekentalan susu sedangkan semen yang buruk derajat konsistensi hampir sama dengan air kelapa (Graner and Hafez, 2000). Konsentrasi spermatozoa sapi Rambon yang diperoleh pada penelitian ini berkisar 780-960 juta/ml dengan rata-rata  $876 \pm 68.4$ . Hasil ini lebih tinggi dari sapi Pesisir 717.33 juta/ml (Siregar, 2018). Perbedaan hasil disebabkan oleh faktor kualitas genetik pada masing-masing sapi pejantan (Situmorang, 2002). Konsentrasi spermatozoa sapi Rambon sudah memenuhi standar kualitas sapi jantan yaitu  $>500$  juta/ml (Ax et al., 2008).

Derajat keasaman atau pH sapi Rambon yang diperoleh pada penelitian ini berkisar antara 6-7 dengan rata-rata  $6.6 \pm 0.54$ . Hasil ini relatif hampir sama dengan pH sapi Bali 7 (Gunawan dkk., 2017), pH sapi Peranakan

Ongole 6.7 (Affandhy dkk., 2017). Derajat keasaman normal pada sapi adalah 6.4-6.8, apabila derajat keasaman rendah disebabkan faktor asam laktat hasil metabolisme spermatozoa (Susilowati dkk., 2010). Menurut Zulyazaini dkk., (2016) bahwa derajat keasaman sangat menentukan hidup atau matinya spermatozoa dalam semen.

Gerakan massa spermatozoa sapi Rambon yang diperoleh pada penelitian ini rata-rata adalah (+++) yang menandakan spermatozoa bergerak membentuk gelombang besar dan *progresif*. Hal ini juga sesuai dengan pendapat Susilawati (2011) yang menyatakan bahwa gerakan massa spermatozoa yang baik apabila terlihat membentuk gelombang yang besar, banyak, gelap, dan aktif seperti awan hitam. Persentase motilitas spermatozoa sapi Rambon berkisar antara 80-95% dengan rata-rata  $83\pm 3\%$ . Hasil ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan sapi Pesisir 59% (Siregar, 2018). Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh umur, spesies, cara penampungan dan frekuensi penampungan (Hafez, 2000). Persentase viabilitas spermatozoa sapi Rambon pada penelitian ini berkisar 86-90% dengan rata-rata  $87.8\pm 2\%$ . Persentase abnormalitas spermatozoa sapi Rambon pada penelitian ini berkisar antara 4.5-5.5% dengan rata-rata  $4.8\pm 0.57\%$ . Hasil ini lebih rendah dari pada sapi Bali yaitu 6.56% (Dewi dkk., 2012). Motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi Rambon sudah memenuhi standar kualitas semen sapi jantan yaitu motilitas  $>50\%$ , viabilitas  $>80\%$  dan abnormalitas  $<20\%$  (Ax et al., 2008).

Hasil analisis statistik yang telah dilakukan dengan menggunakan Anova One Way dan dilanjutkan dengan Uji Duncan, menunjukkan bahwa waktu ekuilibrisasi memberikan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ) terhadap motilitas spermatozoa sapi Rambon Banyuwangi. Waktu ekuilibrisasi 2 jam (P1) menunjukkan perbedaan nyata dengan waktu ekuilibrisasi 4 jam (P3) dan 5 jam (P4). Waktu ekuilibrisasi 2 jam (P1) menunjukkan hasil berbeda tidak nyata terhadap waktu ekuilibrisasi 3 jam (P2) (Tabel 2).

Hasil dari penelitian ini yang menunjukkan motilitas progresif spermatozoa tertinggi

$76.00\pm 2.2/3$  terdapat pada perlakuan P1 dengan waktu ekuilibrisasi 2 jam. Waktu ekuilibrisasi 2 jam pada penelitian ini menunjukkan bahwa sudah tercapai keseimbangan gliserol yang optimal dengan spermatozoa sapi Rambon untuk menyesuaikan dengan pengencer Tris kuning telur, spermatozoa memberikan kesempatan yang optimal terhadap gliserol untuk masuk ke dalam membran plasma spermatozoa dan mengikat substrat yang terdapat dalam sel spermatozoa hanya mengandung nutrisi dan cadangan energi yang minimal namun masih sanggup digunakan sampai pencairan spermatozoa kembali. Waktu ekuilibrisasi 2-4 jam merupakan waktu yang cocok untuk pembekuan spermatozoa (Shahverdi et al., 2006).

Hasil terendah pada penelitian ini terdapat pada perlakuan P4 dengan ekuilibrisasi 5 jam diperoleh rata-rata motilitas sebanyak  $52.00\pm 2.7/2$ . Hasil ini sesuai dengan Sugiarti dkk., (2004) menyatakan bahwa penyimpanan spermatozoa dalam rentang waktu yang lama akan mengakibatkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa dari metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menurun menjadi asam akibat penurunan pH dalam kondisi ini dapat juga bersifat racun bagi spermatozoa sehingga dapat menyebabkan kematian spermatozoa.

Penurunan persentase motilitas spermatozoa pada waktu ekuilibrisasi menurut Salisbury and Van Denmark (1995) yang dikutip oleh Akredianto, (2014) menyatakan bahwa tenaga yang dibutuhkan spermatozoa berasal dari perombakan ATP (Adenosin Tri-Phospat) yang berada didalam selubung mitokondria teraktifkan oleh enzim tertentu sehingga ikatan fosfat yang mengandung banyak energi terurai dan melepaskan energi, akan tetapi penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin dan terlalu lama membuat membran spermatozoa rusak dan menyebabkan enzim untuk merobak ATP hilang sehingga mengakibatkan motilitas yang rendah pada spermatozoa.

Hasil analisis statistik yang telah dilakukan dengan menggunakan Anova One Way dan dilanjutkan dengan Uji Duncan, menunjukkan bahwa waktu ekuilibrisasi memberikan perbedaan

**Tabel 1.** Kualitas semen segar sapi Rambon Banyuwangi

Kualitas	Rata-rata ± SD
<b>Makroskopis</b>	
Volume (ml)	3 ± 0.16
Bau	Khas sapi
Warna	Putih
Derajat keasaman (pH)	6.6 ± 0.54
Konsistensi	Kental
<b>Mikroskopis</b>	
Motilitas (%)	83 ± 3/3
Konsentrasi (juta/ml)	876 ± 68.4
Viabilitas (%)	87.8 ± 2
Gerakan massa	+++
Abnormalitas sekunder (%)	4.8 ± 0.57

**Tabel 2.** Rata-rata dan standar deviasi hasil ekuilibrisasi spermatozoa Sapi Rambon Banyuwangi

Perlakuan	Motilitas	Viabilitas	Abnormalitas
P1 (2 jam)	76.00 <sup>a</sup> ±2.2/3	86.00 <sup>a</sup> ±1.41	3.7 <sup>b</sup> ±0.75
P2 (3 jam)	73.00 <sup>a</sup> ±2.7/3	78.00 <sup>b</sup> ±2.73	3.8 <sup>b</sup> ±0.75
P3 (4 jam)	67.00 <sup>b</sup> ±2.7/3	72.00 <sup>c</sup> ±5.70	4.4 <sup>ab</sup> ±1.08
P4 (5 jam)	52.00 <sup>c</sup> ±2.7/2	57.00 <sup>d</sup> ±2.73	5.2 <sup>a</sup> ±0.57

nyata ( $p < 0.05$ ) terhadap viabilitas spermatozoa sapi Rambon Banyuwangi. Waktu ekuilibrisasi 2 jam (P1) menunjukkan perbedaan nyata dengan waktu ekuilibrisasi 3 jam (P2), 4 jam (P3) dan 5 jam (P4) (Tabel 2).

Hasil dari penelitian ini yang menunjukkan viabilitas spermatozoa tertinggi 86.00±1.41 terdapat pada perlakuan P1 dengan waktu ekuilibrisasi 2 jam. Waktu ekuilibrisasi 2 jam pada penelitian ini sudah terjadi keseimbangan elektrolit dengan gliserol secara sempurna dan merata di dalam sel spermatozoa sehingga kerusakan selama proses pembekuan dapat diminimalisir. Membran plasma pada saat kondisi seperti ini menunjukkan kestabilan fungsi yang baik sehingga tidak mudah ditembus oleh zat warna pada saat uji viabilitas spermatozoa (Anggarsari, 2015).

Hasil dari penelitian ini yang menunjukkan viabilitas spermatozoa terendah 57.00±2.73 terdapat pada perlakuan P4 dengan waktu ekuilibrisasi 5 jam. waktu ekuilibrisasi yang lama kemungkinan membuat gliserol menjadi toksik sehingga membuat kerusakan pada membran plasma spermatozoa dan membuat viabilitas spermatozoa rendah (Apriyanti, 2012).

Penurunan persentase viabilitas spermatozoa disebabkan oleh kondisi membran plasma yang telah rusak. Membran plasma spermatozoa berfungsi sebagai penjaga organel sel dan pengatur keseimbangan elektrolit dalam metabolisme (Salmah, 2014). Apabila membran plasma mengalami kerusakan membuat metabolisme spermatozoa akan terganggu dan spermatozoa kehilangan kemampuan fertilitasnya dikarenakan komponen seluler lepas dan kehilangan daya inaktivasi komponen protein enzim penting di dalam akrosom. Kejadian ini membuat spermatozoa mengalami kematian dan akan berdampak pada viabilitas spermatozoa (Yulnawati dan Agus, 2005).

Hasil analisis statistik yang telah dilakukan dengan menggunakan Anova One Way dan dilanjutkan dengan Uji Duncan, menunjukkan bahwa waktu ekuilibrisasi memberikan perbedaan nyata ( $p < 0.05$ ) terhadap abnormalitas spermatozoa sapi Rambon Banyuwangi. Waktu ekuilibrisasi 5 jam (P4) menunjukkan perbedaan nyata dengan waktu ekuilibrisasi 3 jam (P2), 2 jam (P1). Waktu ekuilibrisasi 5 jam (P4) menunjukkan hasil berbeda tidak nyata terhadap waktu ekuilibrisasi 4 jam (P3), begitu juga dengan waktu

ekuilibrase 4 jam (P3) terhadap waktu ekuilibrase 3 jam (P2) dan 2 jam (P1).

Hasil penelitian abnormalitas spermatozoa terendah terdapat pada perlakuan ekuilibrase selama 2 jam (P1) yaitu 3.7%, dan rataan abnormalitas tertinggi terdapat pada waktu ekuilibrase 5 jam (P4) yaitu 5.2%. Perbedaan persentase abnormalitas spermatozoa pada setiap perlakuan dikarenakan dalam larutan pengencer keseimbangan intraseluler dan ekstraseluler dengan spermatozoa tidak stabil karena adanya penurunan suhu pada saat ekuilibrase (Tuhu *et al.*, 2013).

Menurut Herdiawan, (2004) perbedaan konsentrasi cairan intraseluler dengan ekstraseluler akan menimbulkan perubahan tekanan osmotik sel selama pembekuan, sehingga akan menyebabkan selubung lipoprotein pecah dan membran sel mengalami kerusakan. Kondisi tersebut dapat menyebabkan spermatozoa menjadi abnormal. Perbedaan laju pembekuan spermatozoa pada media yang berbeda akan berpengaruh pada tingkat abnormalitas spermatozoa sebagai akibat terjadinya perubahan fisik media hidupnya, baik perubahan tekanan osmotik, maupun pembentukan kristal-kristal es intraseluler. Hal tersebut dapat membuat struktur pada spermatozoa berubah seperti bentuk spermatozoa ekor tergulung atau kepala terlepas (Siregar, 2018).

Menurut Solihati dkk., (2008) abnormalitas spermatozoa terjadi karena adanya suhu dingin dan tekanan osmotik yang tidak seimbang akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama masa penyimpanan pada suhu 5°C.

### KESIMPULAN

Terdapat perbedaan kualitas spermatozoa sapi Rambon dimana persentase motilitas dan viabilitas paling tinggi terdapat pada waktu ekuilibrase 2 jam, sedangkan persentase abnormalitas paling rendah terdapat pada waktu ekuilibrase 2 jam.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada kepala Dinas Pertanian Banyuwangi dan Prodi Kedokteran Hewan PSDKU Universitas Airlangga di Banyuwangi atas dukungan dan fasilitas yang diberikan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Affandy, L., Dian, R., Mochamad, L. 2017. Pengaruh Pemberian Kombinasi Jamu Tradisional Terhadap Kualitas Semen dan Libido Sapi Peranakan Ongole. Loka Penelitian Sapi Potong. Grati-Pasuruan. Trad. Med. J., 22(2), 84-90.
- Aila, I. 2016. Penambahan L-arginin dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin Post Thawing pada Semen Beku [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. p17-18.
- Akredianto, B.R.D. 2014. Pengaruh Waktu Ekuilibrase terhadap Motilitas dan Viabilitas Kambing Gembrong *Post Thawing* dalam Pengencer Skim Kuning Telur [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. p9-14.
- Anggarsari, L.Y. 2015. Pengaruh Waktu Ekuilibrase terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Kambing Boer *After Thawing* dalam Pengencer yang Mengandung Lisitin Nabati [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. p9-14.
- Apriyanti, C. 2012. Pengaruh Waktu Ekuilibrase Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Pesisir Pre dan Post Thawing [Tesis]. Program Studi Ilmu Ternak Universitas Andalas. p8-16.
- Ax, R.L., Dally, M.R., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., Bellin, M. E. 2000. Semen Evaluation. Lippincot Williams & Wilkins. p365-375.

- Dewi, A.S., Yon, S.O., Edy, K. 2012. Kualitas Semen Berdasarkan Umur pada Sapi Jantan Jawa. *Anim. Agricult. J.*, 1(2), 126-133.
- Dinas Pertanian Kabupaten Banyuwangi. 2017. Rekap Populasi Ternak Per Wilayah (ekor). Dinas Pertanian Kabupaten Banyuwangi. Banyuwangi.
- Dinas Pertanian Kabupaten Banyuwangi. 2018. Rekap Populasi Ternak Per Wilayah (ekor). Dinas Pertanian Kabupaten Banyuwangi. Banyuwangi.
- Garner, D.L., Hafez, E.S.E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: E. S.E. Hafez (Ed.). *Reproduction in Farm Animal*. 7<sup>th</sup>. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. p96-106.
- Gunawan, M., Kaiin, M.E., Ridwan, R. 2017. Peningkatan Produktivitas Sapi Bali Melalui Inseminasi Buatan dengan Sperma Sexing di Techno Park Banyumelek, Nusa Tenggara Barat. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiv. Indones.*, 3(1), 216-219.
- Hafez, E.S.E. 2000. Semen Evaluation. In : *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland, USA.
- Herdiawan. 2004. Pengaruh Laju Penurunan Suhu dan Jenis Pengenceran terhadap Kualitas Semen Beku Domba Priangan. PT. Gramedia. Jakarta.
- Kartasudjana, R. 2001. *Teknik Inseminasi Buatan*. Jakarta: Departemen Pendidikan Nasional.
- Nugroho, E.S., Susilawati, T., Novanti, I. 2013. Socioeconomic Potential of Indonesian Native Cattle in Supporting Meat Self-Sufficiency in Indonesia. *J. Livestock Res. Rural Dev.*, 25(11).
- Ratnawati, D., Lukman, A., Pratiwi, W.C., Prihandini, P.W. 2009. Pengaruh Pemberian Suplemen Tradisional terhadap Kualitas Semen Pejantan Sapi Bali. *Loka Penelitian Sapi Potong*. Semarang.
- Salmah, N. 2014. Motilitas, Presentase Hidup dan Abnormlitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Bali Pada Pengenceran Andromed dan Tris Kuning Telur [Skripsi]. Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Makasar. p37-38.
- Savitri, F.K., Suharyati, S., Siswanto. 2014. Kualitas Semen Beku Sapi Bali dengan Penambahan Berbagai Dosis Vitamin C pada Bahan Pengencer Skim Kuning Telur. *Fakultas Pertanian Universitas Bandar Lampung*. p30-36.
- Shahverdi A., Rastegarnia A., Topraggaleh T.R. 2014. Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell J.*, 16, 279–288.
- Siregar, F.K. 2018. Pengaruh Waktu Ekuilibrasi terhadap Kualitas Sapi Pesisir Sebelum Proses Pembekuan [Skripsi]. Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang.
- Situmorang, P. 2002. The effects of inclusion of exogenous phospholipid in trisdiluent containing adiferent level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. *Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. Bogor, 7(3), 131-187.
- Solihati, N., Idi, R., Rasad, S.D., Rizal, M., Fitriati, M. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis sapi peranakan ongol (po) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. *Anim. Prod.*, 10(1), 22-29.
- Sugiarti, T., Triwulanningsih, E., Situmorang, P., Dianturi, R.G., Kusumaningrum, D.A. 2004.

- Penggunaan katalase dalam produksi semen dingin sapi. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, p215-220.
- Susilawati, T. 2011. Spermatologi. UB Press. Malang. p95.
- Susilowati., Hardijanto, S., Suprayogi, T.W., Sardjito, T., Hernawati, T. 2010. Penuntun Praktikum Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. p11- 24, 29-30.
- Tuhu, A.D., Yon, S.O., Samsudewa, D. 2013. Effect of different water jacket release time in equilibration process on quality semen of java cattle at before freezing and post thawing. Anim. Agric. J., 2(1), 466-477.
- Zulyazini., Dasrul, S., Wahyuni, M., Akmal, Abdullah, M.A.N. 2016. Karakteristik Semen dan Plasma Seminalis Sapi Aceh Yang Dipelihara di BIBD Saree Aceh Besar. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala. Agripet, 16(2), 121-127.

\*\*\*