

PENGARUH PERBEDAAN METODE *THAWING* TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU DAN KEBERHASILAN INSEMINASI BUATAN PADA SAPI PFH DI KECAMATAN TENGARAN KABUPATEN SEMARANG

THE EFFECT OF DIFFERENCE THAWING METHODS ON THE QUALITY OF FROZEN SEMEN AND THE SUCCESS OF ARTIFICIAL INSEMINATION IN PFH COWS IN TENGARAN DISTRICT SEMARANG

Andi Kristiyawan¹, Zakaria Husein Abdurrahman^{2*}, Purwadi²

¹Mahasiswa Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Boyolali, Boyolali, Indonesia

²Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Boyolali, Boyolali, Indonesia

*E-mail korespondensi: zhabdurrahman@mail.uby.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh perbedaan metode *thawing* menggunakan air hangat suhu 37 °C dengan air es suhu 5 °C terhadap kualitas semen beku dan keberhasilan inseminasi buatan (IB) pada sapi PFH di Kecamatan Tengaran. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Semen beku (straw) produksi BIB Ungaran dengan pejantan Ramaeden kode bull 30908 bacth P 044, Sapi yang digunakan adalah sapi betina peranakan Fries Holstein (PFH) umur kisaran kurang lebih 3 tahun dengan mengetahui tanggalnya 2 gigi depan, BCS 3 – 4, dan sedang pada masa birahi / estrus. Rancangan percobaan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) kedalam dua perlakuan dengan 8 ulangan (P1 dan P) dan 10 kali ulangan (U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8, U9, U10). Hasil kuantitatif kualitas semen beku *Thawing* menggunakan air hangat suhu 37°C selama 30 detik antara lain Motilitas 71,67 %, Persentase spermatozoa hidup 64,51 %, Abnormalitas 17,99 %, Mortalitas 35,36 % sedangkan kualitas semen beku *Thawing* menggunakan air es suhu 5°C selama 30 menit antara lain Motilitas 63,94 %, Persentase spermatozoa hidup 31,61 %, Abnormalitas 20,36 %, Mortalitas 72,71 %. Hasil Penelitian kemudian di analisa menggunakan Uji T untuk mengetahui pengaruh perlakuan parameter dan pengamatan dengan menggunakan program SPSS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan yang memberi perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,05$) adalah motilitas spermatozoa, viabilitas spermatozoa, mortalitas spermatozoa dan sevice per conception (S/C). Sedangkan abnormalitas spermatozoa tidak berbeda nyata ($P < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah dapat disimpulkan bahwa Penggunaan perbedaan metode *thawing* menggunakan air hangat dengan suhu 37 °C selama 30 detik lebih baik dibandingkan dengan menggunakan air es suhu 5 °C selama 30 menit.

Kata kunci: *Thawing*, IB, kualitas, semen, keberhasilan.

ABSTRACT

This study aims to determine the effect of different thawing methods using warm water at a temperature of 37 °C and ice water at a temperature of 5 °C on the quality of frozen semen and the success of artificial insemination (AI) in PFH cows in Tenganan District. The material used in this research is frozen semen (straw) produced by BIB Ungaran with Ramaeden bull code 30908 bacht P 044. The cow used is a Holstein Fries crossbred female (PFH) approximately 3 years old with the date of the 2 front teeth, BCS 3 – 4, and is in heat / estrus. The experimental design in this study was a Completely Randomized Design (CRD) into two treatments with 8 replications (P1 and P) and 10 replications (U1, U2, U3, U4, U5, U6, U7, U8, U9, U10). The research results were then analyzed using the T test to determine the effect of treatment parameters and observations using the SPSS program. The results of the study showed that the treatments that made a very significant difference ($P < 0.05$) were spermatozoa motility, spermatozoa viability, spermatozoa mortality and service per conception (S/C). Meanwhile, spermatozoa abnormalities were not significantly different ($P < 0.05$). The conclusion of this research is that the use of different thawing methods using warm water with a temperature of 37 °C for 30 seconds is better than using ice water with a temperature of 5 °C for 30 minutes.

Keywords: Thawing, AI, quality, cement, success

PENDAHULUAN

Peningkatan populasi produksi ternak untuk mencukupi kebutuhan dalam negeri, meningkatkan ekspor dan mengurangi impor menuju swasembada protein hewani merupakan salah satu tujuan dari pembangunan peternakan yang tertuang dalam “panca usaha pembangunan peternakan” yang hendak dicapai pemerintah. Populasi dan produksi ternak akan meningkat bila disertai dengan penanganan yang memadahi dan terpadu dalam tatalaksana manajemen, pakan, dan reproduksinya. Salah satu aspek dari upaya reproduksi ternak adalah inseminasi buatan (Samsudewa, 2008).

Inseminasi buatan atau yang biasa disebut dengan IB merupakan proses perkawinan secara non alami yang melibatkan manusia pada pelaksanaannya. IB dapat diartikan sebagai proses mempertemukan sperma dengan sel telur dengan tujuan akan terjadi fertilisasi atau pembuahan. Inseminasi buatan termasuk dalam salah satu

bioteknologi reproduksi dengan tujuan meningkatkan mutu genetik ternak.

Tujuan dari teknologi IB adalah untuk menggunakan pejantan terpilih secara lebih efektif dan efisien, mencegah penyebaran penyakit melalui fasilitas reproduksi, atau meminimalisir kendala saat pejantan dan betina dikawinkan secara alami (Dwiyanto, 2007). Keunggulan dari IB antara lain dapat meminimalisir resiko penularan penyakit veneris atau kelamin menular, dapat meningkatkan kapasitas pejantan unggul untuk melayani betina, menurunkan biaya dan risiko pemeliharaan hewan, menurunkan kemungkinan penyebaran penyakit menular seksual, dan mendorong peternak untuk melakukan recording (mencatat) dengan cermat (Hardijanto *et al.*, 2010).

Semen beku adalah obyek yang digunakan ketika sedang melakukan IB. Manfaat dari semen beku adalah masa simpannya yang lebih lama; namun, kekurangannya adalah kualitas spermatozoa dapat menurun setelah diencerkan karena suhu ekstrem yang harus ditahan oleh spermatozoa selama proses pembekuan.

Inseminasi buatan tidak akan berhasil dengan baik jika semen beku berkualitas rendah (Garner and Hafez, 2000).

Semen beku yang digunakan untuk IB harus dilakukan *thawing* setelah dikeluarkan dari wadah yang berisi N₂ cair, yang memiliki suhu -196 derajat Celcius dengan tujuan semen beku dapat dimasukkan ke dalam organ reproduksi betina, semen beku harus di *thawing* terlebih dahulu dengan menggunakan media, suhu dan waktu tertentu. Variasi kualitas semen beku pasca pencairan dapat disebabkan oleh waktu pencairan yang berbeda-beda (Salim *et al.*, 2012).

Kecamatan Tengeran merupakan daerah yang memiliki potensi cukup baik dalam industri pengembangan sapi potong dan sapi perah. Luas dari Kecamatan ini adalah 47,29 km persegi dan terbagi menjadi 15 Desa. Mayoritas penduduknya bekerja sebagai petani atau peternak, dan hampir setiap kepala keluarga memiliki hewan ternak, seperti sapi perah, sapi potong, dan domba, yang digunakan sebagai sumber pendapatan tambahan dan tabungan untuk biaya tak terduga. Sebagian besar masyarakatnya petani dan peternak, hampir setiap kepala keluarga memiliki hewan ternak seperti sapi perah, sapi potong, domba, dan kambing untuk dijadikan penghasilan utama dan tambahan serta tabungan untuk kebutuhan yang mendadak. Dari data yang diperoleh pada dinas peternakan setempat Populasi sapi perah di daerah Kecamatan Tengeran adalah 3.151 ekor, sapi potong 5560 ekor, kambing 10.613 ekor, domba 10.295 ekor, kuda 208 ekor, dan kerbau 9 (Distarigan kab. Semarang, 2021).

Kecamatan Tengeran ini memiliki satu Puskesmas dan 4 ulub dibawah naungan Dinas Pertanian Perikanan dan Pangan Kabupaten Semarang. Dalam melayani masyarakat / peternak yang berkaitan dengan kesehatan hewan dan Inseminasi buatan terdapat Dokter hewan, Paramedis, dan 4 Inseminator. Pada setiap Inseminator memiliki cara – cara yang berbeda dalam melakukan

proses Inseminasi Buatan, salah satunya adalah dalam melakukan "*thawing*". Dalam melakukan *thawing* pada umumnya menggunakan air es dengan suhu 5°C dan waktu yang digunakan untuk sampai ketempat peternak antara 30 – 60 menit. Ini dikarenakan tidak adanya container lapang / mini container 1,5 L yang dimiliki oleh petugas inseminator (PPL, 2009). Hal ini tentunya tidak sesuai dengan standar yang dikeluarkan oleh Balai Inseminasi Buatan dan juga Dinas peternakan setempat yang mana suhu dalam melakukan *thawing* yang baik adalah di kisaran suhu 37°C dan waktunya 30 detik.

Kualitas semen beku yang buruk dan keahlian inseminator dalam melakukan proses *thawing* merupakan dua hambatan dan rintangan bagi keberhasilan inseminasi buatan di lapangan. Secara umum, inseminator cenderung kurang memperhatikan suhu selama periode *thawing*, yang berakibat pada penurunan motilitas spermatozoa setelah pencairan dan pembiakan ulang. (Pratiwi *et al.*, 2006). Tingkat viabilitas dan motilitas yang rendah, serta persentase spermatozoa yang tidak mampu bertahan hidup, merupakan tanda-tanda kualitas semen beku yang buruk pasca proses *thawing* (Salim *et al.*, 2012).

Pentingnya menganalisis metode *thawing* merupakan faktor utama yang harus dipenuhi dalam pelaksanaan IB. Metode *thawing* yang tidak tepat dapat merusak spermatozoa, menurunkan kualitas semen beku dan mungkin menurunkan tingkat keberhasilan IB. Di sisi lain, ada berbagai macam metode *thawing* dalam beberapa pustaka, yang mengarah pada berbagai macam metode *thawing* yang digunakan di lapangan. Direktorat Jenderal Peternakan telah membakukan metode *thawing* menggunakan air pada suhu 37°C selama 30 detik, untuk menghasilkan semen beku berkualitas tinggi. Akan tetapi, faktor kemudahan pelaksanaan menjadi pertimbangan inseminator dalam pelaksanaan *thawing*. Namun, inseminator

memperhitungkan kesederhanaan pelaksanaan saat melakukan *thawing*. Ada beberapa teknik pencairan lain yang digunakan di lapangan, seperti air es, air sumur, es lilin, dan bahkan ada inseminator yang menggunakan pelepah pisang. (Samsudewa, 2008).

Sebelum melakukan inseminasi buatan, Semen beku terlebih dahulu di "*thawing*" pada media suhu dan waktu yang tepat dan sesegera mungkin diinseminasikan pada sapi betina yang sedang birahi / estrus. Akan tetapi kenyataan dilapangan sering kali berbeda, hal ini dapat dilihat pada pengamatan didaerah kecamatan Tengaran Kabupaten Semarang menunjukkan bahwa lama waktu yang ditempuh dari tempat semen beku di "*thawing*" sampai ke tempat akseptor berkisar 5 – 60 menit dan proses *thawing* dilakukan dengan memasukkan semen beku ke dalam wadah yang berisi air keran atau air sumur. Bahkan tak jarang ada inseminator yang melakukan *thawing* dengan menggunakan air es untuk dibawa sebelum inseminasi selama berjam jam hal ini tentunya merupakan kendala bagi fertilitas spermatozoa, sebab fertilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh suhu dan lama "*thawing*". *Mini container* dengan nitrogen cair di dalamnya yang digunakan untuk membawa semen beku (*straw*) tidak tersedia, dan kenyamanan dalam melaksanakan inseminasi buatan merupakan keterbatasan lain bagi para inseminator (PPL, 2009).

Hal tersebut tentunya dapat mengurangi keberhasilan dalam Inseminasi buatan, sebab menurut BIB Ungaran (2007), Pada proses pemindahan *straw*, dimana *straw* akan mengalami keadaan berada di udara luar yang merugikan, haruslah diusahakan dalam waktu yang sesingkat – singkatnya. Untuk ukuran *straw* medium waktu mediumnya adalah 3 detik. Waktu yang diperlukan untuk proses *thawing* adalah 15 detik yang bertujuan supaya semen beku dapat mencair dengan sempurna sebelum dilakukan proses inseminasi. Meskipun waktu

thawing itu bisa jauh lebih lama lagi, yaitu sampai satu jam, akan tetapi makin cepat *straw* dipergunakan akan semakin lebih baik.

Straw mani beku yang sudah mengalami proses *thawing*, tidak boleh disimpan kembali didalam *container*. Azasnya ialah bahwa perlakuan terhadap mani beku tidak boleh berada dalam suhu yang berayun (*fluctuate*), sekali mani beku keluar dari *container* yang bersuhu – 196 °C, ia harus berada didalam suhu yang meninggi sampai ia ditumpahkan kedalam peranakan betina pada waktu inseminasi. Sebab naik turunnya suhu akan menimbulkan akibat yang merugikan semen (BIB Ungaran, 2007).

Berdasarkan uraian tersebut menunjukkan bahwa perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memastikan dampak dari dua metode *thawing* yang berbeda, yaitu udara pada suhu 37°C selama 30 detik dan pada suhu 5°C selama 30 menit, terhadap hasil dari inseminasi buatan (IB) di Kecamatan Tengaran, Kabupaten Semarang, pada sapi Peranakan *Friesien Holstein* (PFH).

MATERI DAN METODE

Penelitian tentang pengaruh perbedaan metode *thawing* menggunakan air hangat 37 °C dengan waktu 30 detik dengan menggunakan air es suhu 5 °C dengan waktu 30 menit dengan fokus keberhasilan pada inseminasi buatan (IB) pada sapi PFH ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro dan wilayah tugas inseminator Kecamatan Tengaran Kabupaten Semarang selama 2 bulan.

Bahan dan alat yang digunakan antara lain mikroskop, objek glass, cover glass, cairan eosin 2%, mini container kapasitas 3 L, termometer, termos *thawing*, gunting, pinset, pipet, tisu dan cool box. Sapi yang digunakan adalah sapi betina Peranakan *Fries Holstein* (PFH) yang sedang birahi (*Estrus*) sebanyak 16 ekor milik pelaku usaha ternak sapi perah yang berada di Kecamatan Tengaran,

Kabupaten Semarang. Umur D2/P1 (Penanggalan gigi seri 2, beranak 1 kali) dan BCS 3-4, yaitu metode menilai tubuh ternak dengan melihat kondisi tubuh maupun dengan perabaan pada timbunan lemak dibawah kulit sekitar pangkal ekor. BCS 3-4 memiliki makna sapi dalam keadaan baik dan cukup dalam memperoleh asupan pakan sehingga tampak tidak kurus dan tidak gemuk (sedang) sehingga baik untuk proses inseminasi buatan. Sapi dalam keadaan birahi ditandai dengan seringnya melenguh, menaiki sapi yang lain, gelisah, napsu makan dan produksi susu menurun, vulva memerah bengkak hangat, serta keluar lender berwarna putih transparan. Straw yang digunakan adalah *Straw* produksi Balai Inseminasi Buatan (BIB) Ungaran menggunakan Pejantan *Fries Holstein* (FH) nama Ramaeden 30908 Batch e 47. Kode 30908 memiliki makna 3 adalah kode pejantah FH, 09 tahun lahir pejantan, 08 no urut pejantan di BIB Ungaran. Batch e 47 memiliki arti e tahun pengambilan semen / koleksi yaitu tahun 2014, 4 bulan April dan 7 adalah tanggal 7. Perlengkapan inseminasi buatan (IB) yang digunakan adalah *insemination gun* (Gun IB), Thermometer, Plastik *sheath*, *Glove* (sarung tangan plastik), Gunting, Pelicin (sabun mandi, sabun cuci), Kapas atau tisu, Termos *thawing*. buku harian inseminator, bolpoin, kartu recording model A.II, dan buku catatan.

Perlakuan yang diberikan adalah sebagai T1: *Thawing* menggunakan air hangat suhu 37 °C dengan waktu 30 detik kemudian diamati menggunakan mikroskop untuk mengetahui motilitas, persentase hidup spermatozoa, abnormalitas dan mortalitas spermatozoa. Kemudian diinseminasikan pada sapi betina PFH yang sedang birahi (*estrus*). T2: *Thawing* menggunakan air es suhu 5 °C dengan waktu 30 menit kemudian diamati menggunakan mikroskop untuk mengetahui motilitas, persentase hidup spermatozoa, abnormalitas dan mortalitas spermatozoa. Kemudian diinseminasikan

pada sapi betina PFH yang sedang birahi (*estrus*).

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dengan melakukan *thawing* serta inseminasi buatan (IB) pada sapi betina PFH yang sedang birahi (*estrus*) dan tahap pengamatan terhadap sapi betina PFH setelah diinseminasi. Metode *Thawing* dengan air suhu 37 °C dengan waktu 30 detik. Menyediakan air hangat dengan suhu 37 °C pada termos *thawing*, kemudian mengambil *straw* dari *container*. *Straw* diambil secepat mungkin dan langsung ditempatkan atau dimasukkan ke dalam gelas yang telah berisi air suhu 37 °C tersebut hal ini untuk menghindari *cold shock*. Setelah itu diamkan selama 30 detik baru kemudian digunakan untuk menginseminasi sapi Peranakan *Fries Holstein* (PFH) yang sedang birahi (*estrus*).

Metode air es suhu 5 °C selama 30 menit dengan cara menyediakan termos *thawing* yang telah diisi dengan air es suhu 5 °C, kemudian mengambil *straw* dari *container* dan langsung ditempatkan pada gelas tersebut. Diamkan selama 30 menit atau menuju tempat akseptor yang ditempuh selama kurang lebih 30 menit. Baru kemudian diinseminasikan pada sapi Peranakan *Fries Holstein* (PFH) yang sedang birahi (*estrus*).

Tahap Inseminasi Buatan yaitu menyiapkan peralatan inseminasi buatan (IB) yaitu *nsemination gun*, plastik *sheath*, *glove* (sarung tangan) plastik, gunting, pelicin (detergent, sabun mandi), kapas atau tisu. Tahapan inseminasi dengan mengambil *insemination gun*, kemudian menarik pangkal kebelakang agar piston besi dapat masuk kedalam, sebab jika tidak ditarik kebelakang piston tersebut akan menghalangi masuknya *straw*. Memasukkan *straw* yang sudah di *thawing* kedalam *insemination gun*, lalu potong bagian ujung *straw* menggunakan gunting agar semen dapat keluar sebab bagian ujung tersebut terdapat sumbat laboratorium (*laboratory plug*), kemudian bungkus *insemination gun* dengan menggunakan plastik *sheath* yang steril, bagian yang tersobek

masukkan terlebih dahulu. Melakukan inseminasi dengan menggunakan metode rectovaginal. Setelah selesai melakukan Inseminasi tersebut baru dilakukan pencatatan (*recording*). Diagnosa kebuntingan dilakukan secara palpasi perrectal setelah 2 bulan di inseminasi tidak terjadi estrus / birahi.

Penelitian ini dirancang menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) kedalam dua perlakuan dan 8 ulangan. Data hasil Penelitian di analisa Uji T guna mengetahui pengaruh perlakuan dan pengamatan menggunakan program SPSS. Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis secara statistik untuk mengetahui kemaknaannya dengan Uji T untuk mencari letak perbedaannya. (Hadi, 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian pengaruh perbedaan metode thawing terhadap kualitas semen beku dan keberhasilan inseminasi buatan (IB) pada sapi PFH di Kecamatan Tenganan, Dengan menggunakan Air hangat suhu 37°C selama 30 detik dengan air es suhu 5°C selama 30 menit diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil analisa statistik data penelitian metode thawing yang berbeda menggunakan air hangat suhu 37°C selama 30 detik dan air es suhu 5°C selama 30 menit

Perl motilitas	PSH	abnormalitas	mortalitas	S/C
P1 71,67% ^a	64,51% ^a	17,99% ^a	35,36% ^a	1.3 ^a
P2 63,94% ^b	31,61% ^b	20,36% ^a	72,7% ^{1 b}	2 ^b

Keterangan: Superskrip huruf kecil yang berbeda pada kolom yang sama menunjukan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Hasil penelitian dan pengamatan motilitas spermatozoa metode thawing dengan air hangat suhu 37 °C selama 30 detik memiliki nilai 71,67 %. Sedangkan hasil pengamatan metode thawing dengan air es suhu 5 °C selama 30 menit memiliki nilai 63,94 %. Dari hasil tersebut dapat ditarik

kesimpulan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ($P \leq 0,01$) antara kedua metode thawing tersebut. Ketika proses thawing dengan menggunakan air hangat pada suhu 37°C selama 30 detik, nilai motilitas lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan air es untuk proses thawing pada suhu 5°C selama 30 menit.

Pada thawing suhu 5 °C terjadi penurunan daya motilitas spermatozoa karena pada suhu rendah mengakibatkan struktur fosfolipid membran plasma akan berubah dari fase cair menjadi fase gel atau lebih kental. Selain itu pada suhu rendah pengeluaran krioprotektan sempurna tetapi metabolisme berjalan tidak optimal sehingga motilitas berjalan tidak optimal mengakibatkan nilai motilitas spermatozoa yang dihasilkan mengalami penurunan. Hal ini didukung dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ansary *et al* (2010) motilitas yang baik yaitu pada teknik thawing menggunakan 37 °C dengan waktu 30 detik karena suhu thawing yang lebih rendah akan menghasilkan angka motilitas yang rendah.

Karena suhu pencairan 37°C sesuai dengan suhu fisiologis pada umumnya, maka mengindikasikan bahwa metabolisme spermatozoa dapat berjalan dengan sempurna pada suhu ini. Selain itu, spermatozoa memiliki mekanisme yang mencegah tekanan osmotik sekaligus mempercepat gliserol intraseluler. Peristiwa tekanan osmotik pada spermatozoa selama pembekuan dan proses thawing semen beku menyebabkan ketidakseimbangan pada konfigurasi lipid protein membran spermatozoa, yang pada saatnya berdampak pada keseimbangan osmotik. Selain itu, terbukti bahwa setelah 30 menit pada suhu 5°C, proporsi motilitas individu mulai menurun. Hal ini mengindikasikan bahwa penurunan motilitas individu dapat terjadi jika suhu thawing lebih rendah.

Ketika spermatozoa dicairkan pada suhu yang terlalu rendah atau tinggi, struktur lipid protein membran menjadi tidak

seimbang dan tidak sesuai dengan parameter fisiologis yang diperlukan untuk pergerakan spermatozoa karena tekanan osmotiknya. Hal ini menyebabkan penurunan motilitas dan mobilitas spermatozoa (Daud dan Suryawijaya, 2008). Karena proporsi motilitas spermatozoa lebih besar pada suhu 37°C dibandingkan dengan suhu 5°C, maka suhu ini lebih sesuai untuk melakukan *thawingspermatozoa* hidup. Kemampuan lingkungan untuk menahan panas melalui konduksi, konveksi, dan penguapan tidak berkurang secara signifikan pada suhu 37°C, sehingga memungkinkan semen beku mencair sepenuhnya dan meningkatkan motilitas spermatozoa selama proses pencairan. Pramunico (2003) berpendapat bahwa apabila yang terjadi pada membran spermatozoa tidak berada di bawah tekanan osmotik yang berlebihan pada suhu 37°C, motilitas spermatozoa dapat menjadi lebih aktif.

Menurut Widyastuti (2001) apabila spermatozoa bergerak ke depan, maka dianggap progresif. Motilitas atau pergerakan sperma sangat penting untuk keberhasilan pembuahan. Daya gerak atau motilitas spermatozoa menjadi tolak ukur untuk menentukan kualitas semen (Nugroho, 2003). Berdasarkan penelitian dari Zelpina *et al* (2012) menunjukkan bahwa proses *thawing* dilakukan pada suhu 37°C dengan waktu 30 detik memiliki persentase motilitas yang lebih besar jika dibandingkan dengan pencairan pada suhu 5°C selama 30 menit.

Nilai motilitas spermatozoa yang kurang dari 40% mengindikasikan bahwa semen beku dengan *post thawing motility* (PTM) tidak cocok untuk IB (Samsudewa, 2008). Didukung dengan pendapat Ansary *et al.*, (2010) saat menggunakan proses *thawing*, motilitas yang baik dapat dicapai dengan memanaskan air hingga 37°C dengan 30 detik. Jumlah motilitas yang lebih rendah akan dihasilkan dari suhu pencairan yang lebih rendah. Berdasarkan pernyataan tersebut, sesuai dengan temuan penelitian yang menunjukkan penurunan nilai motilitas rata-

rata ketika prosedur pencairan digunakan dengan waktu 30 menit pada suhu 5°C.

Pelepasan krioprotektan sangat ideal pada suhu rendah, tetapi metabolisme menjadi tidak optimal, sehingga motilitas menjadi tidak optimal yang menurunkan nilai motilitas spermatozoa yang dihasilkan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa P2 yang melibatkan pencairan pada suhu 5°C selama 30 menit, lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan P1 karena pencairan pada suhu rendah juga menyebabkan struktur fosfolipid membran plasma bertransisi dari fase cair ke fase gel atau lebih kental. Selain suhu rendah selama proses pencairan, suhu tinggi juga mempengaruhi motilitas spermatozoa. Hal ini disebabkan oleh pernyataan bahwa metabolisme spermatozoa berjalan normal selama fase pencairan, tetapi proses penghilangan krioprotektan belum selesai. Penghilangan yang tidak sempurna ini dapat menyebabkan keracunan dan kerusakan spermatozoa, yang pada gilirannya dapat menurunkan motilitas spermatozoa.

Proses metabolisme spermatozoa akan meningkat pada suhu tinggi dalam media *thawing*, sehingga menghasilkan kebutuhan energi yang lebih tinggi. Spermatozoa dengan cepat kehilangan energi dalam keadaan seperti itu, yang menyebabkan kematiannya (Zelpina *et al.*, 2012).

Menurut Gordon (2002) motilitas dan viabilitas sperma paling baik pada suhu 30-37°C dengan waktu 30 detik saat *post thawing*. Straw semen sapi yang di *thawing* pada suhu 37°C mendapatkan hasil fertilitas lebih tinggi dibandingkan dengan air dingin atau 5°C (Pace *et al.*, 1981 dalam Nur *et al.*, 2006).

Persentase hasil berdasarkan pengamatan viabilitas spermatozoa setelah pencairan semen beku menggunakan air hangat pada suhu 37°C selama 30 detik adalah 64,51%, sedangkan persentase berdasarkan pencairan menggunakan air es pada suhu 5°C selama 30 menit adalah 31,61%. Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa nilai viabilitas *thawing* menggunakan air hangat suhu 37 °C

selama 30 detik dengan *thawing* menggunakan air es suhu 5 °C selama 30 menit berbeda sangat nyata ($P < 0,01$).

Presentase hidup spermatozoa menunjukkan lebih tinggi ketika *dithawing* dalam air hangat pada suhu 37°C dalam 30 detik. Hal ini mengindikasikan bahwa membran plasma masih utuh secara fisik, melindungi organel sel spermatozoa dan menyediakan bahan makanan dan ion yang diperlukan untuk aktivitas metabolisme. Jika membran plasma sel masih utuh, maka sel dapat secara efektif mengontrol aliran substrat dan elektrolit ke dalam dan ke luar sel, yang diperlukan untuk metabolisme sel yang efisien.

Uji kualitas yang disebut viabilitas digunakan untuk menghitung proporsi spermatozoa yang diperlakukan yang hidup atau mati. Pewarnaan eosin digunakan dalam uji viabilitas untuk mengidentifikasi spermatozoa yang hidup atau mati berdasarkan variasi warna. Spermatozoa yang tidak berwarna dari spermatozoa hidup menunjukkan bahwa mereka tidak menyerap pewarna, sedangkan spermatozoa yang berwarna-warni dari spermatozoa yang tidak hidup menunjukkan bahwa mereka menyerap warna.

Pada *thawing* dengan suhu 5°C persentase hidup spermatozoa rendah di karenakan membrane plasma sudah tidak lagi utuh secara fisik, sehingga organel sel spermatozoa tidak tercukupi kebutuhan za makanan dan ion untuk proses metabolisme. Oyeyemi *et al* (2000) menyatakan bahwa bila terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraselular, maka permeabilitas fosfolipid hidrofilik rusak dan menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa.

Fluktuasi suhu ekstraseluler yang tidak tepat menyebabkan kerusakan pada permeabilitas fosfolipid hidrofilik dan menghambat fluiditas membran, yang pada

akhirnya berakibat pada kematian spermatozoa (Oyeyemi *et al.*, 2000). Sayoko *et al.*, (2007) menyatakan bahwa apabila terdapat lebih banyak spermatozoa hidup dapat dihasilkan selama *thawing* ketika laju perubahan suhu dalam semen meningkat. Ketika dilakukan proses *thawing* dengan air yang dipanaskan dengan benar, hal ini dapat dicapai. Kecepatan perubahan spermatozoa selama proses pencairan akan mengurangi tekanan pada spermatozoa saat mereka melewati masa krusial, atau fase transisi, dengan lebih cepat. Hal ini akan meningkatkan jumlah spermatozoa yang layak dan normal sebagai hasilnya meningkatkan tingkat pembuahan. Biasanya, spermatozoa mengalami kerusakan selama fase transisi ini.

Jumlah asam laktat yang tidak teroksidasi dari metabolisme spermatozoa merupakan alasan lain yang berkontribusi terhadap rendahnya proporsi spermatozoa yang layak setelah pembekuan. Penumpukan asam laktat menyebabkan keasaman larutan meningkat, yang berbahaya bagi spermatozoa selama perkembangannya. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa *thawing* menggunakan air hangat pada suhu 37°C dengan waktu 30 detik menghasilkan nilai viabilitas yang tinggi.

Hal ini dapat dijelaskan bahwa suhu dan waktu tersebut ideal untuk kondisi spermatozoa, dan prosedur *thawing* tersebut merupakan prosedur yang paling efektif dan sesuai dengan pedoman Balai Besar Inseminasi Buatan. Saryoko *et al.*, (2007) menyatakan bahwa ketika dicairkan selama 30 menit, proporsi spermatozoa yang layak hidup tidak setinggi ketika dicairkan selama 30 detik.

Berdasarkan hasil pengamatan abnormalitas setelah dilakukan *thawing* dengan menggunakan air hangat pada suhu 37 °C selama 30 detik mendapatkan nilai 17, 99 % sedangkan dengan air es suhu 5 °C selama 30 menit 20,36 %, maka dapat disimpulkan bahwa abnormalitas pada dua

metode *thawing* yang berbeda tersebut tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Abnormalitas kedua metode *thawing* tersebut layak digunakan untuk melakukan inseminasi buatan (IB). Hal ini sejalan dengan penelitian Ihsan (2009), yang menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa kurang dari 20% masih dapat diterima pada semen beku untuk IB dan abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% akan menurunkan tingkat fertilitas.

Penelitian ini mencakup spermatozoa dengan berbagai macam abnormalitas, termasuk kepala kecil, ekor melingkar, ekor retak, dan ekor patah. Pengelompokan abnormalitas terbagi menjadi dua kategori: abnormalitas primer yang terjadi pada tubulus seminiferus selama spermatogenesis, seperti kepala besar (*macrocephalic*), kepala kecil (*microcephalic*), kepala ganda, ekor ganda, dan ekor melingkar. Sedangkan abnormalitas sekunder yang terjadi setelah sperma meninggalkan tubulus seminiferus, selama perjalanan menuju epididimis, ejakulasi, dan faktor lain akibat sepertitempat penampungan yang kotor dan suhu tinggi, seperti kepala dan ekor yang terputus secara normal (McPeake dan Pennington, 2009).

Analisis ragam menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa tidak secara signifikan dipengaruhi oleh waktu *thawing* yang tepat. Kesalahan dalam ejakulasi atau persiapan *thawing* diasumsikan sebagai sumber abnormalitas yang muncul. Didukung dengan pendapat Arifiantini *etal.*, (2006) kesalahan dalam ejakulasi atau persiapan *thawing* dapat menjadi penyebab abnormalitas sekunder. Guncangan suhu dan ejakulasi tidak sempurna dapat menjadi penyebab abnormalitas pada ekor.

Pengamatan terhadap abnormalitas spermatozoa muncul dari hasil penelitian bahwa, pada semua perlakuan, suhu dan lama *thawing* tidak memberikan tekanan atau pengaruh mekanis yang signifikan, sehingga menyebabkan spermatozoa menjadi abnormal seperti halnya ciri-ciri abnormalitas tersier.

Kepala atau ekor yang terputus merupakan salah satu ciri-ciri spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier. Berdasarkan temuan tersebut, sebagian besar abnormalitas adalah spermatozoa dengan kepala atau ekor yang patah atau terputus. Namun mengindikasikan bahwa prosedur persiapan, seperti membuat preparat ulas, adalah yang menyebabkan kondisi ini, bukan proses *thawing*. Kepala atau ekor spermatozoa yang putus selama preparat ulas dapat menjadi penyebab anomali tersier (Yulnawati *et al.*, 2009). Didukung dengan pendapat Suyadi *et al.*, (2012) peroksidasi lipid dan pembuatan preparat pra-pengamatan adalah penyebab meningkatnya tingkat abnormalitas.

Pada hasil pengamatan mortalitas metode *thawing* dengan air hangat suhu 37 °C selama 30 detik mendapatkan nilai 35,36 %. Sedangkan hasil pengamatan mortalitas metode *thawing* dengan air es suhu 5 °C selama 30 menit memiliki nilai 72,71 %. Maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan metode *thawing* air hangat suhu 37 °C selama 30 detik dengan air es suhu 5 °C selama 30 menit memiliki perbedaan yang sangat nyata ($P<0,01$). Dari hasil pengamatan tersebut metode *thawing* dengan air hangat suhu 37 °C selama 30 detik memiliki nilai mortalitas yang lebih rendah / sedikit dibandingkan dengan metode *thawing* dengan air es suhu 5 °C selama 30 menit.

Mortalitas adalah jumlah spermatozoa yang mati setelah dilakukan *thawing* dengan dua perlakuan yang berbeda yaitu menggunakan air hangat dengan suhu 37 °C selama 30 detik dan dengan air es suhu 5 °C selama 30 menit. Sebaliknya, daya hidup mengacu pada kapasitas spermatozoa untuk bertahan dalam pengenceran, seperti yang ditunjukkan oleh kemampuannya untuk terus bermigrasi hingga tidak mampu lagi melakukannya. Sperma yang motil akan hidup, tetapi sperma yang hidup tidak selalu motil dan sperma yang tidak bergerak disebut mortal atau mati (Triana, 2006).

Mobilitas spermatozoa menurun selama fase pengenceran. Hal ini diduga disebabkan oleh meningkatnya keasaman pH semen setelah pengenceran dan meningkatnya jumlah spermatozoa yang rusak dan mati sebagai akibat dari kandungan nutrisi yang buruk dan kurangnya ketersediaan energi (Solihati dan Kune, 2009). Tambing *et al.*, (2003) menyatakan bahwa karena fosfolipase A memiliki sifat toksik bagi semen selama proses pengenceran, maka diyakini bahwa aktivitas enzim ini merupakan sumber keasaman pH.

Berdasarkan hasil Service / Conception (S/C) pada inseminasi buatan (IB) *thawing* dengan metode yang berbeda pada semen beku menggunakan air hangat suhu 37 °C selama 30 detik mendapatkan hasil 1.3 sedangkan dengan menggunakan air es suhu 5 °C selama 30 menit mendapatkan hasil 2. Dari hal tersebut dapat disimpulkan bahwa S/C *thawing* menggunakan air hangat suhu 37 °C selama 30 detik dengan *thawing* menggunakan air es suhu 5 °C selama 30 menit berbeda sangat nyata ($P < 0,01$).

Sesuai dengan hasil inseminasi buatan di lapangan P1 memiliki hasil yg lebih baik dibandingkan dengan P2, sebab motilitas spermatozoa mempengaruhi Tingkat keberhasilan fertilisasi. Salah satu indikator yang digunakan untuk menilai kualitas spermatozoa adalah motilitas spermatozoa, yang didefinisikan sebagai kemampuan spermatozoa untuk bermigrasi ke depan setelah pencairan. Motilitas diperlukan agar spermatozoa dapat mencapai tahap perkembangan saat memecah dinding sel telur. Jumlah total spermatozoa yang aktif dan hidup sehat menentukan tingkat suburnium spermatozoa (Hafez, 1993). Seluruh organel yang berhubungan dengan motilitas spermatozoa terletak di bagian ekor, yang memungkinkan spermatozoa bergerak dalam gelombang yang dimulai dari kepala dan bergerak ke arah ekor.

Motilitas individu yang dilakukan dengan melihat pergerakan spermatozoa yang

maju (progresif). Pergerakan individu spermatozoa menjadi faktor yang mempengaruhi keberhasilan IB. Spermatozoa individu biasanya bergerak secara progresif atau maju. agar bisa melakukan fertilisasi. Pergerakan spermatozoa progresif diperlukan untuk transportasi di saluran reproduksi betina, sehingga dapat terjadi fertilisasi.

Jumlah persentase spermatozoa hidup (PSH) sangat mempengaruhi keberhasilan inseminasi buatan disuatu tempat tertentu sebab menurut Hidayanti (2002) inseminasi buatan membutuhkan 50% spermatozoa yang hidup. Untuk melindungi organel sel spermatozoa, viabilitas pada perlakuan *thawing* P1 dengan menggunakan air hangat pada suhu 37°C dengan 30 detik mengindikasikan bahwa persentase viabilitas tetap berada dalam kisaran normal. Persentase spermatozoa hidup yang tinggi juga menunjukkan bahwa membran plasma sebagian besar masih utuh, yang mengindikasikan ketersediaan nutrisi dan ion yang diperlukan untuk fungsi metabolisme.

Menurut Arianti *et al.* (2020) persentase abnormalitas yang tinggi pada semen beku dikaitkan dengan tingkat fertilitas yang lebih rendah karena hal ini mempengaruhi kapasitas untuk memulai dan mempertahankan perkembangan embrio. Penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa meskipun waktu yang dihabiskan sesuai dengan standar yang berlaku, *thawing* menggunakan air es pada suhu 5°C selama 30 menit kurang sesuai untuk inseminasi karena suhu yang lebih rendah akan merusak morfologi spermatozoa. Didukung dengan pendapat Putranti *et al.*, (2010) Salah satu elemen yang paling penting dalam IB adalah tingkat abnormalitas karena hanya spermatozoa yang sehat atau tidak rusak yang memiliki kemungkinan besar untuk fertilisasi.

Angka konsepsi pada P2 lebih rendah dari pada P1, hal ini di sebabkan asam laktat dari metabolisme sel hadir selama proses pendinginan pada suhu 5°C menyebabkan motilitas spermatozoa akan menurun.

Penurunan pH ini akan membuat kondisi medium menjadi lebih asam. Spermatozoa dapat diracuni oleh kondisi ini, yang pada akhirnya mengakibatkan kematian spermatozoa (Sugiarti *et al.* 2004). Hal ini dikarenakan semakin lama waktu *thawing* maka akan terjadi peningkatan pada persentase mortalitas spermatozoa pada semen beku. Dimana mortalitas tertinggi yaitu pada lama waktu *thawing* menggunakan air es suhu 5 °C selama 30 menit sebesar 72,71 %. Sedangkan pada *thawing* suhu 37 °C selama 30 detik sebesar 35,36%.

Tekanan panas dan interaksi oksigen mengakibatkan membran spermatozoa rusak akibat waktu *thawing* yang tidak tepat. Asam lemak diproduksi sebagai hasil dari proses peroksidasi sel, yang menurunkan membran spermatozoa berbasis fosfolipid. Karena sperma mengalami perubahan lingkungan yang substansial selama pemrosesan semen, maka viabilitas sperma pasti akan hilang. Didukung dengan pendapat Anwar *et al.* (2014) bahwa untuk menghasilkan peningkatan asam laktat yang menurunkan PH pengencer dan menghasilkan sifat toksik demi kelangsungan hidup spermatozoa, spermatozoa akan secara agresif terlibat dalam aksi biomolekul kimiawi yang memetabolisme substrat yang diperlukan untuk motilitas.

Jumlah perkawinan yang diperlukan untuk menghasilkan kehamilan dikenal sebagai Service per conception atau S/C. Menurut Nuryadi dan Wahyuningsih (2011) kisaran normal untuk S/C adalah 1,6 hingga 2,0. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kisaran ini termasuk peternak yang terlambat mengidentifikasi atau memberi tahu inseminator tentang sapi yang sedang berahi, kelainan pada organ reproduksi induk sapi, transportasi yang sulit, kurangnya fasilitas layanan inseminasi, dan inseminator yang kurang berpengalaman yang mungkin mengalami kesulitan dalam mencairkan semen beku.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa perbedaan metode *thawing* menggunakan air hangat dengan suhu 37 °C selama 30 detik lebih baik dibandingkan dengan menggunakan air es suhu 5 °C selama 30 menit. Hasil pemeriksaan dan pengamatan semen beku secara mikroskopis yang mana nilai/angka baik motilitas, persentase hidup spermatozoa dan mortalitas semen beku pada menggunakan metode *thawing* dengan air suhu 37 °C selama 30 detik sangat baik dan tinggi. Hasil S/C inseminasi buatan di lapangan metode *thawing* dengan air suhu 37 °C selama 30 detik adalah 1,3, Menunjukkan tingkat keberhasilan Inseminasi buatan (IB) yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar P, Ondho Y, Samsudewa D. 2014. Pengaruh Pengencer ekstrak air tebu dengan penambahan kuning telur terhadap kualitas spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Peternakan*, 11(2), 48-58.
- Arianti, N., N. W. T. Inggriati, dan N. P. Sarini. 2020. Hubungan antara Karakteristik Inseminator dengan Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Ternak Sapi di kabupaten Tabanan. *Journal of Tropical Animal Science*. 8 (1): 1-15.
- Arifiantini, R. I., T. Wresdiyati dan E.F. Retnani. 2006. Pengujian Morfologi Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Menggunakan Pewarnaan "Williams". *J. Indontrop. Anim. Agric.* 31 (2) : 105-110.
- Awaluddin, dan T. Panjaitan. 2010. *Petunjuk Praktis Pengukuran Ternak Sapi Potong*. Balai Pengkajian Pertanian. NTB.
- Balai Inseminasi Buatan Ungaran, 2007. *Diktat Inseminasi Buatan Dengan Semen Beku*. Dinas Peternakan Provinsi Jawa Tengah, Semarang.

- Encinias, A. M and G, Lardy. 2000. Body Condition Scoring I: Managing Your Cow Herd Through Body Condition Scoring.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. London: Butterworths.
- Fauzan M, M. Hartono, PE. Santosa. 2014. Pengaruh Suhu dan Lama Thawing di Dataran Rendah Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Brahman. Fakultas Peternakan, Universitas Lampung.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak. Bandung: Alfa beta.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In Reproduction in Farm Animal. 7th ed., E.S.E. Hafez (ed). Lea and Febiger Publishing, Philadelphia.
- Gordon, I. (2002) Controlled Reproduction in Cattle and Buffaloes, CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Hadi, S. 1996. *Statistik Jilid III*, Edisi pertama, Penerbit Andi Offset, Yogyakarta.
- Hadisusanto, B. 2008. Pengaruh Paritas Induk terhadap Performans Sapi Perah Fries Holland, Bandung.
- Hardijanto dan Aiman. 2010. Ilmu Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hayati, S, Yuniardi dan A. Gozali, A. 2002. Hubungan Antara Pre-partum Body Condition Score Dengan Panjangnya Puncak Laktasi Sapi Perah FH di BPTHMT Batu Raden. Universitas Jendral Sudirman. Purwokerto.
- Herawati, T. 2012. Peran Inseminator Dalam Keberhasilan Inseminasi Buatan Pada Sapi Perah. Bogor: Hasil Penelitian Balai Penelitian ternak.
- Ihsan, N.M. 2009. Bioteknologi Reproduksi Ternak. Universitas Brawijaya. Malang.
- Komariah, I. Arifiantini dan F. W. Nugraha. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesian holstein terhadap proses pembekuan. Buletin Peternakan. 37(3): 143-147.
- Marawali, A., M.T. Hine., Burhanuddin dan H.L.L. Belli. 2001. Dasar-dasar Ilmu Reproduksi Ternak. Departemen Pendidikan Nasional Direktorat Pendidikan Tinggi Badan Kerjasama Perguruan Tinggi Negeri Indonesia Timur. Jakarta.
- Nur, Z. and Illeri, I.K. (2003) Effect of Different Temperature Treatments Applied to Deep Stored Bull Semen on Post-Thaw Cold Shocked Spermatozoa. Bull. Vet. Inst. Pulawg., 50: 79-83.
- Oyeyemi, M., M.O. Akusu dan O.E. OlaDavis. 2000. Effect of Successive Ejaculations on the Spermogram of West African Dwarf Goats (*Capra hircus* L.). jurnal Veterinarski Arhiv. 70(4): 215-221.
- Partodihardjo, S., 1982. *Reproduksi Hewan Ilmu*. Mutiara, Jakarta.
- Pace, M. M., Sullivan, J.J., Elliot, F. I., Graham, E. F. and Coulter, G. H. (1981) Effect of Thawing Temperature, Number of Spermatozoa and Spermatozoa Quality on Fertility of Bovine Spermatozoa Packaged in 5 ml French Straw. J. Anim. Sci. 35:253.
- Penyuluh Peternakan Lapangan, 2009. *Program Penyuluhan Ternak*. Dinas peternakan, Semarang.
- Putranti O.D., Kustono, Ismaya. 2010. Pengaruh penambahan crudetannin pada sperma cair kambing peranakan ettawa yang disimpan selama 14 hari terhadap viabilitas spermatozoa. Buletin Peternakan 34(1): 1-7.
- Rahman, M. T., Hermawan., dan D. S. Tasripin. 2015. Evaluasi Performa Produksi Susu Sapi Perah Fries Holland (FH) Keturunan Sapi Impor. Laporan Hasil Penelitian Peternakan. Bandung: Universitas Padjajaran.
- Said. 2004. *Pembuahan Buatan*. Balai Penerbitan Indonesia. Jakarta.

- Salim, M.A., Susilawati, T. dan Wahyuningsih, S. (2012) Pengaruh Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet*. 12: 14-19.
- Samsudewa, D., 2008. *Pengaruh Berbagai Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku*. Makalah Seminar Nasional. Fakultas Peternakan. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Samsudewa, D dan A. Suryawijaya. 2008. Pengaruh Berbagai Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Sayoko, Y., M. Hartono, dan Silotonga 2007. Faktor-faktor yang mempengaruhi Persentase Spermatozoa Hidup semen Beku Sapi Pada Berbagai Inseminator di Lampung.
- Solihati, N., dan P. Kuna. 2009. Pengaruh Jenis Pengencer Terhadap Motilitas dan Daya Tahan Hidup Spermatozoa Semen Cair Sapi Simental.
- Sudono, A.R., F. Rosdiana dan B.S. Setiawan. 2005. *Beternak Sapi Perah Secara Intensif*. Agromedia Pustaka: Jakarta.
- Sugoro, I. 2009. *Pemanfaatan Inseminasi Buatan (IB) untuk Peningkatan Reproduksi Sapi*. Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat.
- Sugiarti, T., E. Triwulanningsih, P. Situmorang, R. G. Sianturi dan D. A. Kusumaningrum. 2004. *Penggunaan Katalase dalam Produksi Semen Dingin Sapi*. Puslitbang Peternakan. Bogor.
- Suyadi A, Rachmawati N, Iswanto. 2012. Pengaruh a-Tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethane kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 50C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*. 22 (3):1-8.
- Tambing, S. N., M. R. Toelihere, T. L. Yusuf dan I. K. Utama. 2000. Pengaruh Gliserol dalam Pengencer Tris terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 5(2): 1-8.
- Triana, I. N. 2006. Pengaruh Waktu Inseminasi Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Pasca Inseminasi Pada Kambing. *Berk. Panel. Hayati*. 11: 147-150.
- Toelihere, M. R., 1981. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Cetakan keenam. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Toelihere, M.R., 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Angkasa, Bandung.
- Yulnawati., Herdis, H. Maheswari, A. Boediono dan M. Rizal. 2009. *Potensi Reproduksi dan Upaya Pengembangan Biakan Kerbau Belang Tana Toraja*. Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau.
- Yusuf, T. L., Arifiantiani, R. I dan Mulyadi, Y. 2006. Efektivitas waktu pemaparan gliserol terhadap motilitas spermatozoa pada pembekuan semen domba lokal menggunakan pengencer tris kuning telur. *J. Animal Production*. 8 (3): 168-173.
- Zainudin, M., M.N Ihsan dan Suyadi. 2014. Efisiensi Reproduksi Sapi Perah PFH pada Berbagai Umur di C.V. Milkindo Berka Abadi Desa Tegalsari Kecamatan Kepanjen Kabupaten Malang. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. *J. Ilmu – ilmu Peternakan* 24 (3):32-37.
- Zelpina, E., B. Rosadi, dan T. Sumarsono. 2012. Kualitas spermatozoa post thawing dari semen beku sapi perah. *Jambi. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 15: 94-102.