

Uji Ketahanan Membran Plasma Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole (PO) Menggunakan Larutan *Natrium Chloride* (NaCl) dengan Konsentrasi yang Berbeda

(Plasma Membrane Resistance Test of Spermatozoa of Ongole Crossbreed Cattle Using Sodium Chloride Solutions with Different Concentrations)

Yastrid Dian Syaputri¹, Takdir Saili¹, Achmad Selamat Aku^{1*}

¹Fakultas Peternakan Universitas Halu Oleo, Kampus Hijau Bumi Tridarma Andonuhu
Jl. H.E.A. Mokodompit, Kendari, Sulawesi Tenggara, Indonesia 93232

*Corresponding author: selamat.aku@uho.ac.id

Abstrak. Membran plasma merupakan bagian vital spermatozoa yang berperan dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas sel. Kerusakan membran plasma dapat menurunkan daya gerak bahkan menyebabkan kematian spermatozoa. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi ketahanan membran plasma spermatozoa sapi Peranakan Ongole (PO) menggunakan larutan NaCl dengan konsentrasi berbeda. Penelitian dilaksanakan di UPTD Balai Perbibitan dan Pakan Ternak Provinsi Sulawesi Tenggara menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan, yaitu NaCl 0,7%; 0,8%; 0,9%; 1,0%; dan 1,1%, masing-masing 6 ulangan. Variabel yang diamati meliputi kualitas semen serta persentase membran plasma utuh (MPU), motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa sebelum dan sesudah perlakuan. Data dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan dilanjutkan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan kualitas semen segar sapi PO berada pada kondisi normal dengan volume rata-rata 5,17 ml, konsentrasi spermatozoa 1.462 juta/ml, gerakan massa (++), MPU 89,77%, motilitas 80%, viabilitas 88,50%, dan abnormalitas 1,83%. Setelah perlakuan, persentase MPU tertinggi diperoleh pada NaCl 0,8% (81,45%) dan 0,9% (80,20%). Analisis ragam menunjukkan bahwa konsentrasi larutan NaCl berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase membran plasma utuh, tetapi tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa. Disimpulkan bahwa larutan NaCl dengan konsentrasi 0,8% dan 0,9% merupakan medium terbaik untuk mempertahankan keutuhan membran plasma spermatozoa sapi PO.

Kata kunci : PO, Spermatozoa, Membran Plasma, NaCl.

Abstract. The plasma membrane is a vital component of spermatozoa that plays an essential role in maintaining sperm motility and viability. Damage to the plasma membrane can reduce sperm motility and eventually lead to cell death. This study aimed to evaluate the resistance of the plasma membrane of Peranakan Ongole (PO) bull spermatozoa using different concentrations of NaCl solution. The study was conducted at the Regional Technical Implementation Unit (UPTD) of the Breeding and Animal Feed Center, Southeast Sulawesi Province. A Completely Randomized Design (CRD) consisting of five treatments, namely NaCl concentrations of 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1.0%, and 1.1%, with six replications each, was employed. The observed variables included semen quality and the percentages of intact plasma membrane (IPM), motility, viability, and sperm abnormalities before and after treatment. Data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's Multiple Range Test. The results showed that fresh PO bull semen had normal quality characteristics, with an average volume of 5.17 mL, sperm concentration of $1,462 \times 10^6$ cells/mL, mass movement (++), intact plasma membrane of 89.77%, motility of 80.00%, viability of 88.50%, and abnormalities of 1.83%. After treatment, the highest percentages of intact plasma membrane were observed in the 0.8% NaCl (81.45%) and 0.9% NaCl (80.20%) groups. Analysis of variance revealed that different NaCl concentrations had a highly significant effect ($P < 0.01$) on the percentage of intact plasma membrane but had no significant effect ($P > 0.05$) on sperm motility, viability, or abnormalities. It can be concluded that NaCl solutions at concentrations of 0.8% and 0.9% are the most suitable media for maintaining the integrity of the plasma membrane of PO bull spermatozoa.

Keywords: PO, Spermatozoa, Plasma Membrane, NaCl.

1. Pendahuluan

Membran plasma merupakan bagian yang vital dari sel spermatozoa karena spermatozoa akan menurun daya gerakannya bahkan akan mati jika membrannya rusak. Beberapa aspek yang bisa mempengaruhi kondisi membran plasma adalah suhu, pH, dan tekanan osmosis [1]. Membran plasma yang utuh merupakan hal yang mutlak harus dimiliki spermatozoa yang baik, hal ini disebabkan oleh peran penting membran plasma dengan mengatur berbagai proses biokemik yang berlangsung di dalam sel. Selain berfungsi menjaga organel-organel sel secara fisik, membran plasma berfungsi mengatur lalu lintas keluar masuknya zat atau molekul yang dibutuhkan oleh sel agar berfungsi dengan baik dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses biokemik di dalam sel. Apabila membran plasma mengalami kerusakan, akibatnya proses tersebut tidak dapat berjalan dengan normal, yang pada akhirnya menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa [2].

Keutuhan membran plasma pada spermatozoa dapat dinilai melalui pewarnaan eosin maupun dengan uji *Hypoosmotic Swelling Test* (HOS-test). Uji daya tahan membran plasma bisa dilakukan dengan pemaparan larutan NaCl. Larutan yang biasa dipakai yaitu NaCl yang memiliki konsentrasi 0,9% yang bersifat fisiologis [3]. Karena konsentrasi larutannya sama dengan cairan dalam sel sehingga dapat mempertahankan aktivitas metabolisme sel dan mencegah kerusakan akibat perubahan tekanan osmotik.

Proses pencampuran larutan dengan plasma semen dan spermatozoa secara seimbang dapat menghasilkan kondisi yang isotonis sehingga dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa. Ion Na^+ pada larutan NaCl menjadi faktor dominan dalam *osmolaritas ekstraseluler* sel yang akan menembus plasma semen, sedangkan untuk ion Cl^- akan mempengaruhi spermatozoa. Jika kedua osmolaritas ini terjadi maka larutan NaCl dapat menciptakan kondisi isotonis pada kelangsungan hidup spermatozoa [4]. Berdasarkan uraian tersebut maka dilakukan penelitian dengan judul “uji ketahanan membran plasma spermatozoa sapi peranakan ongole (PO) menggunakan larutan *Sodium Chloride* (NaCl) dengan konsentrasi yang berbeda”. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan level *Sodium Chloride* (NaCl) terhadap ketahanan membran plasma spermatozoa sapi PO.

2. Metode Penelitian

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Balai Perbibitan dan Pakan Ternak, Dinas Tanaman Pangan dan Peternakan Provinsi Sulawesi Tenggara di Desa Morome, Kecamatan Konda, Kabupaten Konawe Selatan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus sampai September tahun 2023.

2.2. Materi

Materi utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen sapi yang diperoleh dari seekor sapi pejantan PO dengan umur 9 tahun dan berat 450 kg yang dipelihara di UPTD Balai Perbibitan Ternak dan Pakan Ternak. Selain itu juga digunakan NaCl dalam berbagai konsentrasi sesuai perlakuan.

Alat-alat yang digunakan antara lain vagina buatan, mikroskop, *objek glass*, *cover glass*, mikropipet, tabung reaksi, tabung Erlenmeyer, aluminium foil, *spectrophotometer* dan *waterbath*.

2.3. Metode

Kegiatan dimulai dengan persiapan penampungan semen kemudian penampungan semen yang dilakukan 2 kali dalam satu minggu dengan menggunakan metode vagina buatan (AV). Tiga hari sebelum dilakukan penampungan, dilakukan persiapan bahan pengencer dengan langkah awal menimbang bubuk NaCl masing-masing sebanyak 0,7 gram, 0,8 gram, 0,9 gram, 1 gram, 1,1 gram. Selanjutnya memasukkan bubuk NaCl masing-masing ke dalam tabung erlenmeyer dan ditambahkan aquadest hingga mencapai volume 100 ml.

Sampel semen segar ditampung menggunakan vagina buatan (*Artificial Vagina/AV*), kemudian kualitasnya dievaluasi melalui pemeriksaan makroskopis (volume, warna, bau dan konsistensi) dan mikroskopis (persentase MPU, persentase motilitas, persentase viabilitas, persentase abnormalitas dan

konsentrasi). Sebanyak 0,1-0,2 ml/ml semen diencerkan dalam larutan NaCl dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan sebanyak 1 ml dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 1 jam.

a. Persentase MPU spermatozoa dihitung menggunakan rumus :

$$\text{MPU} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa dengan Ekor Melingkar}}{\text{Jumlah Spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

b. Persentase motilitas. Penilaian yang diberikan mulai dari nol persen (tidak ada spermatozoa yang bergerak ke depan) sampai 100 persen (semua spermatozoa bergerak ke depan) [5].

c. Persentase viabilitas ditentukan berdasarkan perbandingan antara jumlah spermatozoa hidup dengan jumlah total spermatozoa yang dihitung. Jumlah spermatozoa yang dihitung adalah 200 spermatozoa [6].

d. Persentase abnormalitas spermatozoa dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Abnormalitas Spermatozoa} = \frac{\text{Spermatozoa abnormal}}{\text{Total spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

e. Konsentrasi spermatozoa pada semen segar dihitung dengan menggunakan *spectrophotometer*. Secara jelas, semen diambil sebanyak 10 μL lalu dimasukkan ke dalam kuvet yang berisi NaCl 0,9% sebanyak 2,5 ml. kemudian dihomogenkan selama 7 detik. Selanjutnya, kuvet tersebut dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer untuk perhitungan konsentrasi spermatozoa [5].

Evaluasi dilakukan dengan cara meneteskan semen diatas gelas objek kemudian diamati membran plasma utuh (MPU), motilitas dan abnormalitas. Selanjutnya untuk evaluasi viabilitas untuk mengetahui daya hidup spermatozoa dihomogenkan dengan eosin, dibuat preparate ulas pada gelas objek dan difiksasi kemudian diperiksa dibawah pengamatan mikroskop dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa berkepala putih dan berkepala merah pada pembesaran 400X.

2.4. Rancangan Penelitian

Penelitian telah dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 6 ulangan. Pembuatan larutan disesuaikan dengan konsentrasi NaCl pada perlakuan. Konsentrasi NaCl 0,7% dibuat dengan cara melarutkan 0,7 g NaCl ke dalam 100 ml aquadest. Hal serupa juga dilakukan untuk konsentrasi NaCl yang lain sesuai perlakuan. Setiap perlakuan menggunakan konsentrasi larutan NaCl yang berbeda, yaitu :

P1 = Larutan NaCl 0,7%

P2 = Larutan NaCl 0,8%

P3 = Larutan NaCl 0,9%

P4 = Larutan NaCl 1,0%

P5 = Larutan NaCl 1,1%

2.5. Analisis Data

Data kualitas semen segar baik secara makroskopis maupun mikroskopis dianalisis secara deskriptif. Sedangkan data kualitas spermatozoa setelah perlakuan dianalisis dengan sidik ragam. Perlakuan yang berpengaruh nyata terhadap variabel yang dievaluasi, diuji lanjut untuk mengetahui beda antar perlakuan menggunakan Uji Wilayah Berganda Duncan pada aplikasi IBM SPSS Statistics 26.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Evaluasi semen segar

Evaluasi semen segar pada sapi PO dilakukan secara langsung setelah proses penampungan semen, yang bertujuan untuk mengetahui kelayakan dari semen dan spermatozoa segar tersebut untuk

diproses lebih lanjut. Hasil evaluasi dari semen dan spermatozoa segar secara makroskopis dan mikroskopis disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan Karakteristik Semen dan Spermatozoa Segar Sapi PO

Variabel Pengamatan	Hasil Pengamatan
Volume (ml)	5,17±1,83
Warna	Putih Susu
Bau	Khas Semen
Konsistensi	Agak kental
Gerakan Massa	++
Konsentrasi (juta/ml)	1.462±299,92
MPU (%)	89,77±1,59
Motilitas (%)	80±8,94
Viabilitas (%)	88,50±4,58
Abnormalitas (%)	1,83±0,93

Volume semen sapi PO yang dihasilkan dalam penelitian ini termasuk cukup tinggi tetapi masih bisa disebut dalam kisaran normal yaitu 5,17 ml. Rata-rata volume semen yang dihasilkan sapi Simental berkisar 4,10-8,75 ml, Limousin berkisar 4-7,55 ml, dan Brahman berkisar 2,60-10,20 ml [7]. Semen sapi pejantan normalnya menghasilkan volume semen sekitaran 4-8 ml [8]. Perbedaan volume semen dipengaruhi oleh kondisi ternak umur pejantan, berat badan, makanan dan manajemen penampungan [9]. Warna semen sapi PO yang dihasilkan dari penelitian ini yaitu berwarna putih susu secara umum warna semen sapi yang normal bervariasi antara lain putih keruh, putih susu, krem, krem kekuning-kuningan sampai dengan warna putih keabu-abuan [8].

Bau semen yang dihasilkan adalah bau khas semen. Semen normal pada umumnya mempunyai bau yang khas disertai bau dari hewan tersebut. Bau khas ini menunjukkan semen tidak terkontaminasi baik oleh darah, nanah, urin, maupun unsur lainnya [10]. Konsistensi semen yang dihasilkan dalam penelitian tersebut adalah agak kental. Semen segar yang baik memiliki konsistensi sedang sampai pekat [11]. Bobot badan dapat memengaruhi konsistensi semen. Selain bobot badan, umur juga berpengaruh terhadap konsistensi semen [12].

Gerakan massa spermatozoa sapi PO yang diperoleh dalam penelitian ini adalah ++ yang dimana memperlihatkan adanya pergerakan spermatozoa yang cenderung bergerak bersama-sama dalam kelompok, sehingga membentuk gelombang-gelombang tebal dan tipis. Gerakan massa spermatozoa ++ dalam kategori baik. Dimana dalam jurnal menyatakan bahwa gerakan massa semen segar baik (++), bila terlihat gelombang-gelombang kecil tipis, jarang, kurang jelas dan bergerak lamban [13]. Gerakan massa dikategorikan ke dalam tiga golongan, yaitu 1) pergerakan massa spermatozoa menyerupai awan tebal dan bergerak cepat (+++), 2) pergerakan massa spermatozoa menyerupai awan tebal tetapi bergerak agak lambat (++), 3) pergerakan massa spermatozoa menyerupai awan tipis dan bergerak lambat (+) [14]. Rataan konsentrasi yang dihasilkan dalam penelitian ini yaitu 1.462 juta/ml. Nilai konsentrasi spermatozoa pada penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut masih sesuai dengan standar yaitu di atas 1000 juta/ml [15]. Konsentrasi spermatozoa sapi pejantan dipengaruhi oleh besar testis dan frekuensi penampungan semen yang dilakukan [15].

MPU spermatozoa segar yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah 89,77%. Membran plasma utuh sapi Bali berkisar antara rata-rata 77,58% [16]. Motilitas spermatozoa segar yang didapat dalam

penelitian ini adalah 80%. Rataan nilai motilitas yang dihasilkan pada penelitian tersebut masih sesuai dengan standar yaitu di atas 70% [17].

Semen dengan persentase motilitas spermatozoa di atas 70% memiliki daya tahan hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan semen yang motilitasnya di bawah 70% [17]. Viabilitas spermatozoa segar yang dihasilkan adalah 88,50%. Nilai persentase viabilitas spermatozoa semen segar sapi PO dalam penelitian ini termasuk dalam kategori baik. Persentase viabilitas spermatozoa semen sapi segar yaitu sekitar 60-80% [18]. Abnormalitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini adalah 1,83%. Pejantan dengan fertilitas semen yang baik harus memiliki persentase abnormalitas spermatozoa kurang dari 20% [19].

3.2. Evaluasi Spermatozoa

Hasil evaluasi persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan nilai persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah perlakuan

Variabel	Perlakuan					Rataan umum
	P1(0,7%)	P2(0,8%)	P3(0,9%)	P4(1%)	P5(1,1%)	
Motilitas	75,00±5,48	73,33±5,16	76,67±5,16	73,33±5,16	71,67±4,08	74,00±4,98
Viabilitas	76,83 ±5,96	75±8,20	85,85±5,32	74,4±30,95	69±10,37	76,28±16,49
Abnormalitas	4,75±1,21	3,75±1,92	4,83±1,33	3,42±1,53	3,58±1,39	4,07±1,52

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan perbedaan konsentrasi NaCl tidak berpengaruh nyata ($P>0,01$) terhadap persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi PO. Hal ini diduga karena tidak adanya kerusakan pada motilitas, viabilitas dan abnormalitas pada spermatozoa yang disebabkan oleh perbedaan konsentrasi larutan NaCl. Persentase motilitas spermatozoa sapi PO setelah diinkubasi di dalam larutan NaCl dengan level konsentrasi berbeda pada penelitian ini berkisar antara 71,67%-76,67% dengan rataan umum 74,00%. Hal ini menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa sapi PO dalam penelitian ini termasuk dalam kondisi sangat baik dikarenakan melebihi dari batas syarat semen yang diencerkan yaitu di atas 70%. Motilitas spermatozoa pada sapi masih berada dalam kisaran 40-75%, dan untuk dapat digunakan sebagai semen encer atau semen beku, motilitas spermatozoanya harus mencapai minimal 70% [18].

Persentase viabilitas spermatozoa setelah diinkubasi di dalam larutan NaCl dengan level konsentrasi berbeda dalam penelitian ini berkisar antara 69%-85,85% dengan rataan umum 76,28%. Viabilitas spermatozoa untuk pembuatan semen cair atau semen beku minimal memiliki 60% sampai 75% spermatozoa hidup [17]. Angka abnormalitas spermatozoa yang dihasilkan pada penelitian ini berkisar 3,42–4,83% dengan rataan umum 4,07%. Nilai rataan ini masih di bawah 20% yang artinya baik untuk IB. Abnormalitas yang baik untuk IB mempunyai nilai abnormalitas <20% [18].

3.3. Evaluasi Membran Plasma Utuh Spermatozoa Sapi PO

Hasil evaluasi persentase membran plasma utuh spermatozoa sapi PO setelah perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan nilai persentase membran plasma utuh spermatozoa sapi PO setelah perlakuan

Perlakuan	Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa (%)
P1 (0,7%)	69,31±6,08 ^{bc}
P2 (0,8%)	81,45±5,27 ^d
P3 (0,9%)	80,20±4,40 ^{cd}
P4 (1%)	68,06±3,23 ^b
P5 (1,1%)	52,30±12,54 ^a

Keterangan : superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$).
1,1% nilai MPU menjadi rendah dikarenakan tekanan dalam larutan tersebut makin tinggi yang menyebabkan kerusakan metabolisme sel.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase keutuhan membran plasma spermatozoa. Hal ini diduga karena adanya kerusakan membran dan ketidakseimbangan tekanan osmotik pada spermatozoa yang disebabkan oleh perbedaan konsentrasi larutan NaCl. Larutan 0,6%-0,8% masih bisa ditoleransi oleh sel, sedangkan 0,9% merupakan kondisi yang sama dengan sel dalam tubuh maka nilai MPU akan baik namun jika lebih dari 0,9% MPU akan rusak karena terlalu tinggi tekanan osmotiknya. Selanjutnya berdasarkan hasil uji Duncan diketahui bahwa persentase MPU spermatozoa pada perlakuan P2 (81,45%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P1 (69,31%), P4 (68,06%) dan P5 (52,30%), tetapi tidak berbeda nyata dengan P3 (80,20%). Nilai rataan pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang dilaporkan sebelumnya dengan nilai rataan 54,55-89,29% [3]. Perbedaan kondisi membran plasma spermatozoa di sebabkan oleh perbedaan konsentrasi larutan yang digunakan. Larutan NaCl 0,9% merupakan larutan isotonik bersifat fisiologis yang mempunyai konsentrasi zat terlarut yang sama (tekanan osmotik yang sama) seperti larutan yang lain, sehingga tidak ada pergerakan air dari luar ke dalam sel maupun sebaliknya [3].

Nilai rataan membran plasma spermatozoa pada perlakuan P1 (0,7%) dan P2 (0,8%) juga memiliki nilai rataan yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian larutan dengan konsentrasi 0,7% dan 0,8% masih dapat ditoleransi oleh membran plasma spermatozoa sapi PO. Hal ini sesuai dengan pernyataan [3] bahwa spermatozoa umumnya lebih mampu bertahan pada konsentrasi larutan saline (NaCl) yang lebih rendah dari 0,9% dengan batas toleransi hingga 0,6% dibandingkan dengan konsentrasi yang melebihi 0,9%.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa konsentrasi NaCl terbaik adalah 0,8% dan 0,9% yang dapat mempertahankan kondisi membran plasma utuh spermatozoa sapi PO (80,20% dan 81,45%).

5. Daftar Pustaka

- [1] Ismaya. 2017. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Gadjah Mada University Press.
- [2] Rizal M, MR. Toelihere, TL. Yusuf, B. Purwantara dan P. Situmorang. 2002. Kualitas semen beku domba garut dalam berbagai konsentrasi gliserol. *J. Ilmu Ternak dan Veteriner*. 7 (3) : 193-198.
- [3] Fauzya E, T Saili, AB Kimestri dan R Aka. 2020. Kondisi membran plasma spermatozoa sapi bali setelah dipaparkan di dalam larutan saline dengan berbagai konsentrasi. *Jurnal Ilmiah Peternakan Halu Oleo*. 2 (4): 384-353.
- [4] Wiyanti DC, N Isnaini dan P Trisunuwati. 2013. Pengaruh lama simpan semen dalam pengencer nacl fisiologis pada suhu kamar terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung (*Gallus domesticus*). *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7 (1) : 53-55.
- [5] Saili T. 2014. *Pengantar Teknologi Reproduksi*. Tunggal Mandiri. Malang.

- [6] Kudratullah, AS Sudrajat. 2021. Motilitas, Viabilitas, dan Morfologi Spermatozoa Ayam Bangkok dengan Pengencer Dextrose dan Nacl Fisiologis 10% Pada Penyimpanan Suhu 5⁰ C dan 26⁰ C. *Indonesian Journal of Applied Science and Technology*. 2 (1) : 1-9.
- [7] Sumeidiana I, S Wuwuh, dan E Mawarti. 2007. Volume Semen dan Konsentrasi Sperma Sapi Simmental, Limousin dan Brahman Di Balai Inseminasi Buatan Ungaran. *Journal of Indonesian tropical Animal Agriculture*. 32 (2) :131-137.
- [8] Arifiantini RI. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*.IPB. Press: Bogor.
- [9] Melita D, Dasrul, dan M Adam. 2014. Pengaruh umur pejantan dan frekuensi ejakulasi terhadap kualitas spermatozoa sapi Aceh. *Jurnal Medika Veterinaria*. 8(1):15-19.
- [10] Kartasudjana R. 2001. *Teknik Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- [11] Suharyantana, B Muwakid dan S Wahjuningsih. 2017. Kualitas semen segar dan recovery rate (RR) sapi limmousin pada musim yang berbeda. *J. Ternak Trop*, 18(1):36-50.
- [12] Adhyatma M, N Isnaini dan Nuryadi. 2013. Pengaruh bobot badan terhadap kualitas dan kuantitas semen sapi simmental. *J. Ternak Trop*, 14(2):53-62.
- [13] Mila FNH, A Kaka dan YT Ina. 2021. Karakteristik dan Kualitas Semen Sapi Sumba Ongole dalam Pengencer Tris yang Disuplementasi dengan Susu Skim yang Disimpan pada Suhu 3-5 °C. *Jurnal Sains dan Teknologi Peternakan* 3(1) : 12-18.
- [14] Saili T. 2014. *Pengantar Teknologi Reproduksi*. Tunggal Mandiri. Malang.
- [15] Komariah, RI Arifiantini dan FW Nugraha. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesland holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan*. 37(3):143-147.
- [16] Bardan, Feradis, dan T. Adelina. 2009. Penggunaan Air Tebu yang Dikombinasikan Dengan Kuning Telur Sebagai Pengencer Semen Sapi Bali. *Jurnal Peternakan*. 6(2) : 37-44.
- [17] Susilawati T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Malang: UB Press.
- [18] Garner DL dan ESE Hafez. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In:ESE Hafez (Ed). *Reproduction in farm animal*. 7 th. ed. *Lippomcott wiliams and wilkins*. Philadelphia: 96-106.
- [19] Dewi AS, YS Odho dan E Kurnianto. 2012. Kualitas semen berdasarkan umur pada sapi jantan jawa. *Animal Agriculture journal*, 1(2):126-133.