

Motilitas Spermatozoa Sapi Peranakan Ongole (PO) Pasca *Thawing* yang Dikrioperservasi Menggunakan Gliserol dengan Konsentrasi yang Berbeda

(Post-thawing Motility of Ongole Crossbred Cattle's Spermatozoa Cryopreserved Using Glycerol with Different Concentrations)

Anggia Azahrah¹, Achmad Selamat Aku¹, Takdir Saili^{1*}

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

*Corresponding author: takdir69@uho.ac.id

Abstrak. Penggunaan konsentrasi gliserol yang tepat sangat menentukan kualitas spermatozoa sapi PO pada saat proses pembekuan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan gliserol dengan bahan pengencer Tris Kuning Telur terhadap motilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Penelitian ini telah dilaksanakan di Unit Pelaksana Teknis Daerah (UPTD) Balai Perbibitan dan Pakan Ternak, Dinas Tanaman Pangan dan Peternakan Provinsi Sulawesi Tenggara. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah seekor pejantan sapi PO umur 9 tahun dengan bobot badan 450 kg/ekor sebagai sumber semen dan spermatozoa yang dievaluasi. Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan dan 6 kali ulangan. Perlakuan terdiri atas: P1 = Penambahan gliserol 5 %, P2= Penambahan gliserol 6% dan P3= Penambahan gliserol 7%. Variabel yang dievaluasi dalam penelitian ini meliputi kualitas semen (volume, warna, bau dan konsistensi), sedangkan spermatozoa meliputi (gerakan massa, konsentrasi, Persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan menggunakan aplikasi IBM SPSS Statistic 25. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata volume semen sapi PO yang diperoleh $5,17 \pm 1,83$ ml, warna semen putih susu, bau khas semen, konsistensi agak kental, rata-rata gerakan massa ++ dan rata-rata konsentrasi spermatozoa $1.462 \pm 299,92$ juta/ml. Sedangkan rata-rata nilai persentase motilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* untuk P1 (23,33%), P2 (45%) dan P3(21,67%), rata-rata persentase viabilitas untuk P1(28,75%), P2(51,17%) dan P3(28,75%) dan rata-rata persentase abnormalitas untuk P1(4,33%), P2 (5,67%) dan P3(5,00%). Selanjutnya hasil sidik ragam menunjukkan penambahan gliserol dengan konsentrasi berbeda berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas, viabilitas spermatozoa sapi PO tetapi tidak berpengaruh sangat nyata terhadap abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Penambahan gliserol dengan konsentrasi 6% menghasilkan angka motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi PO yang lebih baik dibandingkan dengan penambahan konsentrasi gliserol 5% dan 7%.

Kata kunci: PO, Gliserol, Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas

Abstract. The quality of PO bovine spermatozoa during the freezing process is largely determined by the use of the correct glycerol concentration. The aim of this study is to determine the effect of adding glycerol with the diluent Tris-egg yolk on the motility of PO bovine spermatozoa after thawing. This research was conducted at the UPTD Centre for Breeding and Animal Feed Department of Food Crops and Livestock, Southeast Sulawesi Province. The material used in this research was a 9-year-old PO bull with a body weight of 450 kg/cow as the source of semen and spermatozoa to be evaluated. A completely randomised design (CRD) with 3 treatments and 6 replications was used in this study. Treatment consisted of P1 = addition of 5% glycerol, P2 = addition of 6% glycerol and P3 = addition of 7% glycerol. The variables evaluated in this study include semen quality (volume, colour, odour and consistency) and spermatozoa (mass movement, concentration, percentage of motility, viability and abnormalities). The data obtained were analysed using the analysis of variance and continued with the Duncan test using the IBM SPSS Statistics 25 application. The results showed that the average volume of PO semen obtained was 5.17 ± 1.83 ml, the colour of the cement was milky

white, the odour was typical of cement, the consistency was slightly thick. and the average concentration of spermatozoa was $1,462 \pm 299.92$ million/ml. Meanwhile, the average percentage value of sperm motility after thawing in PO cows for P1 (23.33%), P2 (45%) and P3 (21.67%), the average percentage of viability for P1 (28.75%), P2 (51.17 %) and P3 (28.75%) and the average percentage of abnormalities for P1 (4.33%), P2 (5.67%) and P3 (5.00%). Furthermore, the results of variance showed that the addition of glycerol at different concentrations had a very significant effect ($P < 0.01$) on the motility and viability of PO cow spermatozoa, but did not have a very significant effect on the abnormalities in PO cow spermatozoa after thawing. The addition of glycerol at a concentration of 6% resulted in better motility and viability of PO bovine spermatozoa compared to the addition of glycerol concentrations of 5% and 7%.

Keywords: *PO, Glycerol, Motility, Viability, Abnormality.*

1. Pendahuluan

Teknologi inseminasi buatan atau IB merupakan salah satu bentuk bioteknologi yang diterapkan dalam bidang reproduksi ternak dengan memungkinkan manusia mengawinkan banyak ternak tanpa perlu seekor pejantan. Keuntungan dalam program IB pada sapi diantaranya dapat meningkatkan mutu genetik yang lebih cepat sebab menggunakan semen yang berasal dari pejantan unggul. Salah satu bangsa sapi yang dapat digunakan dalam produksi semen beku adalah sapi PO. Prinsip penerapannya adalah dengan cara menyebarkan semen dari ternak yang dianggap unggul [1].

Keberhasilan dalam pelaksanaan IB diakibatkan oleh banyak faktor di antaranya yaitu kualitas semen. Program IB membutuhkan ketersediaan semen yang berkualitas baik. Kualitas semen khususnya semen beku ditentukan oleh cara pengolahan semen beku dimulai dari penampungan semen hingga proses pembekuan. Pembekuan semen memiliki titik kritis pada saat penambahan zat krioprotektan yang berfungsi untuk melindungi spermatozoa saat pembekuan dan saat penyimpanan pada suhu nitrogen cair -196°C [2].

Penambahan gliserol sebagai krioprotektan dengan konsentrasi berbeda berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa karena gliserol dapat meminimalisir terjadinya kerusakan membran plasma akibat peroksidasi lipid dengan cara mengikat gugus fosfolipid [3]. Berdasarkan uraian latar belakang, maka perlu dilakukan penelitian tentang penambahan gliserol dengan bahan pengencer Tris Kuning Telur terhadap motilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*.

2. Metode Penelitian

2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah 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

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu sapi PO umur 9 tahun dengan berat 450 kg/ekor. Selain itu, juga digunakan pengencer semen Tris-Kuning Telur (Tris-KT), eosin 2% dan gliserol dalam berbagai konsentrasi sesuai perlakuan serta antibiotik *penicillin* dan *streptomycin*. Pada proses pembekuan semen digunakan nitrogen cair.

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini yaitu satu set vagina buatan, thermometer, spektrofotometer, micropipet, gelas ukur, lemari es, *cool top*, aluminium foil, *Counter*, *beaker glass*, mikroskop, *objek glass*, pipet tetes, spoit, kertas label, alat tulis, pingset, labu erlenmeyer, *cover glass*, korek api.

2.3. Metode

Metode kegiatan dimulai dengan persiapan penampungan semen, dilanjutkan dengan proses penampungan yang dilakukan dua kali seminggu menggunakan metode vagina buatan (Artificial Vagina/AV). Tiga hari sebelum penampungan, dilakukan persiapan bahan pengencer dengan langkah awal menimbang tris aminomethan sebanyak 7,74 gram, asam sitrat 4,34 gram, dan fruktosa 3,12 gram.

Selanjutnya masukkan ketiga bahan ke dalam Erlenmeyer dan tambahkan aquadest hingga mencapai volume 200 ml, lalu aduk hingga homogen menggunakan magnetic stirrer. Selanjutnya, siapkan buffer antibiotik (200 ml) dengan menimbang 1 gram reptomisin, lalu larutkan dalam 4 ml aquadest. Setelah itu, timbang 3 juta IU penisilin dan tambahkan 15 ml aquabides. Selanjutnya menimbang buffer sebanyak 198,2 ml, 0,8 ml *streptomycine* dan 1 ml *penicillin* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirer* [4].

Proses pengenceran diawali dengan pengenceran semen yang diperoleh setelah penampungan dengan cara, menuliskan batas volume pengencer yang akan diperlukan dengan spidol non permanen kemudian memberikan label pada gelas ukur sesuai kode perlakuan, selanjutnya menuangkan pengencer part A yang telah disiapkan kedalam tabung spermatozoa, selanjutnya menggoyangkan gelas ukur agar terjadi larutan semen baru yang homogen, lalu didiamkan selama 35 menit di dalam cool top (*water jacket* dengan suhu 37°C) kemudian setelah 15 menit dicampurkan dengan ¼ pengencer part B dan hal tersebut dilakukan sebanyak 3 kali kedalam gelas ukur [5]. Semen yang telah diencerkan selanjutnya diekuilibrasi pada suhu 4-5°C selama 2-6 jam didalam *cool top*, penyimpanan 35 menit pertama dengan kondisi 4°C, harus dilengkapi dengan *water jacket* suhu 37°C [5].

Selanjutnya dilakukan proses *filling and sealing* dimana semen dimasukkan ke dalam straw (0,25 ml) dengan menggunakan spoit, proses *filling and sealing* dilakukan pada suhu mendekati suhu *refrigerator* [6]. Setelah straw dimasukkan, selanjutnya dilakukan proses pembekuan semen dengan cara meletakkan straw berisi semen di atas uap nitrogen cair dengan suhu -80°C. Setelah itu semen dimasukkan ke dalam straw dan disusun pada rak dalam wadah styrofoam berisi nitrogen cair dengan jarak 10 cm dari permukaan nitrogen cair hal ini bertujuan agar straw terpapar uap nitrogen selama 4-5 menit. Straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair kemudian disimpan dalam kontainer yang berisi N₂ cair (suhu -196°C) [7].

Kemudian *thawing* semen beku dilakukan dengan mencelupkan straw yang berisi semen ke dalam air dengan suhu 37°C selama kurang lebih 30 detik. Semen yang telah dicairkan diteteskan pada objek gelas yang dihangatkan dan ditutup dengan gelas penutup. Kemudian diamati motsssssilitas, viabilitas dan abnormalitas.

2.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan dengan 6 ulangan. Setiap perlakuan menggunakan konsentrasi krioprotektan gliserol yang berbeda yaitu :

Perlakuan 1 (P1) = Penambahan gliserol 5%

Perlakuan 2 (P2) = Penambahan gliserol 6%

Perlakuan 3 (P3) = Penambahan gliserol 7%

2.5. Analisis Data

Data dianalisis menggunakan analisis ragam. Apabila Perlakuan memberikan pengaruh yang nyata terhadap variabel yang dievaluasi, diuji lanjut menggunakan uji jarak berganda Duncan pada aplikasi IBM SPSS Statistics 25.

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 semen dan spermatozoa segar tersebut untuk diproses lebih lanjut. Hasil evaluasi semen dan spermatozoa segar secara makroskopis dan mikroskopis dilihat pada Tabel 3.1.

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
Motilitas (%)	80±8,94
Via bilitas (%)	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. Semen sapi pejantan normalnya berkisar antara 5-8ml [8]. Warna semen sapi PO yang diperoleh dari penelitian ini yaitu berwarna putih susu. Warna semen pada sapi umumnya masih berwarna putih kekuning-kuningan atau hampir putih seputih susu karena adanya ribovlavin didalam semen yang bersifat *autosomal resesif* [9].

Bau semen sapi PO yang dihasilkan adalah bau khas semen. Hasil penelitian tersebut menggambarkan terdapat semen dalam keadaan normal tanpa adanya kontaminasi akibat dari bakteri ataupun penyakit yang dapat menyebabkan bau busuk. Hal tersebut menggambarkan bahwa semen tersebut normal seperti bau amis khas spermatozoa yang disertai bau hewan itu sendiri [10]. Konsistensi semen sapi PO yang dihasilkan dalam penelitian tersebut agak kental. [11] semen segar yang baik memiliki konsistensi sedang sampai pekat.

Konsistensi semen juga dipengaruhi oleh musim. Rataan konsentrasi spermatozoa segar sapi PO yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 1.462±299,92 juta/ml. Konsentrasi spermatozoa pada penelitian ini menggambarkan kesesuaian standar yaitu diatas 1000 juta/ml. 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.

Menurut [12], 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. Motilitas spermatozoa segar sapi PO yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 80±8,94%. Adanya perbedaan motilitas pada spermatozoa sapi PO di duga dipengaruhi oleh perbedaan umur ternak yang digunakan sebagai materi penelitian.

[13] menyatakan bahwa perbedaan umur ternak mempengaruhi motilitas spermatozoa karena perbedaan umur dipengaruhi oleh energi untuk daya gerak hidup spermatozoa dan *hormone testosteron*. Viabilitas spermatozoa segar yang diperoleh dalam penelitian ini adalah 88,50±8,58%. Semen segar yang boleh diproses menjadi semen beku harus memiliki nilai persentase spermatozoa hidup normal antara 60% sampai 75% [14]. Abnormalitas spermatozoa sapi PO yang dihasilkan dalam penelitian tersebut sebesar 1,83±0,93%, Pejantan dengan fertilitas semen yang baik harus memiliki persentase jumlah abnormalitas kurang dari 20% [15].

3.2 Evaluasi Spermatozoa

Hasil evaluasi persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* dapat dilihat pada tabel 2.

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

Variabel	Perlakuan			Rataan Umum
	P1	P2	P3	
Motilitas	23,33 ^a ±8,16	45, ^b ±12,25	21,67 ^a ±4,08	30 ±13,72
Viabilitas	28,75 ^a ±8,22	51,17 ^b ±13,95	28,75 ^a ±5,55	36,22 ±14,30
Abnormalitas	4,33 ±1,94	5,67 ±2,86	5,00 ±1,38	5,00 ±2,09

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan sangat nyata ($P < 0,01$).

3.2.1. Motilitas

Hasil analisis ragam menggambar perlakuan gliserol dengan konsentrasi berbeda dan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase motilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Hasil uji Duncan menggambarkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan P2 (45%) nyata lebih tinggi dibandingkan perlakuan P1 (23,33%) dan P3 (21,67%). Hal tersebut diduga gliserol dengan konsentrasi 6% bekerja dengan optimal sehingga spermatozoa dapat beradaptasi dengan pengencer dan gliserol setelah melewati proses ekuilibrisasi selama 4 jam yang mengakibatkan terjadinya kematian spermatozoa.

[16], Menyatakan bahwa gliserol akan memasuki siklus perombakan fruktosa pada tri-fosfat dan selanjutnya akan dirombak menjadi asam laktat, fruktosa yang tersedia ini akan membuat spermatozoa tetap bergerak dalam menghasilkan energi berupa ATP. Energi tersebut mengandung fosfat anorganik yang kaya akan energi.

Hasil analisis ragam menggambarkan perlakuan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda dan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap persentase viabilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Selanjutnya hasil uji Duncan menggambarkan rata-rata persentase viabilitas spermatozoa pada perlakuan P2 (51,17%) nyata lebih tinggi dibandingkan perlakuan P1 (28,75%) dan P3 (28,75%). Hal ini diduga karena penambahan dosis gliserol 6% yang optimal memberikan pengaruh terhadap persentase spermatozoa hidup sebesar 51,17%.

3.2.2. Viabilitas

[17] menyatakan bahwa persentase spermatozoa hidup dari semen sapi Brahman yang diencerkan dengan pengencer tris sitrat kuning telur dengan penambahan gliserol sebanyak 6% memiliki hasil yang terbaik yaitu sebesar 55,52%. Perubahan lingkungan yang sangat ekstrim selama proses *prefreezing* diduga menyebabkan penurunan persentase hidup spermatozoa. Selama *prefreezing* dosis gliserol 6% memberikan hasil optimal, hal ini diduga karena gliserol mampu memberikan perlindungan yang efektif terhadap *cold shock* jika dibandingkan dengan dosis gliserol yang lainnya. Hal ini sesuai dengan pendapat [18] bahwa konsentrasi gliserol yang tinggi diduga terjadi kerusakan kriogenik yang menyebabkan kematian spermatozoa (apoptosis). [19] menyatakan bahwa penurunan viabilitas diduga karena adanya berbagai proses yang terjadi pada spermatozoa antara lain penyimpanan pada suhu rendah. Persentase hidup spermatozoa ditentukan berdasarkan perbandingan antara jumlah spermatozoa hidup dengan total spermatozoa yang akan dihitung. Jumlah total spermatozoa yang dihitung sebanyak 200 spermatozoa [20].

3.2.3. Abnormalitas

Hasil analisis ragam menggambarkan perlakuan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh nyata ($P > 0,01$) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Persentase abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* yang diperoleh pada penelitian ini berkisar antara 4,33- 5,67% dengan rata-rata umum senilai 5,00%. Nilai tersebut berada di bawah angka abnormalitas yang menjadi syarat dalam program inseminasi buatan, yaitu sebesar 10%. [21] mengemukakan bahwa semen yang memiliki angka abnormalitas 15% tidak dapat digunakan untuk program IB.

4. Kesimpulan

Penggunaan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh nyata terhadap persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*, Tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap persentase abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Gliserol dengan konsentrasi 6% menghasilkan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing* yang lebih baik dibandingkan gliserol dengan konsentrasi 5% dan 7%.

5. Daftar Pustaka

- [1] Setiawan D. 2018. Artificial insemination of beef cattle UPSUS SIWAB program based on the calculation of non-return rate, service per conception and calving rate in the north kayong regency. *The Insemination journal of tropical veterinary and biomedical research*, 3(1):7-11.
- [2] Muclisah NB, LO Nafiu dan T Saili. 2020. Motility of bali sexed sperm following equilibration and cryopreservation in different concentrations of ethylene glycol. *Atlantis press Advances in biological Science Research*, 20:187-189.
- [3] Saputra AL, IS Hamid, RA Prastiya dan MTE Purnama. 2018. Hdiroponik fodder jagung sebagai substitusi hijauan pakan ternak ditinjau dari produktivitas susu kambing sapera. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(2) :48-51.
- [4] Sura IW. 2002. *Standar operasi Pembuatan Diluter*. Balai Perbibitan dan Pakan Ternak, Dinas Tanaman Pangan dan Peternakan Sulawesi Tenggara. Kendari
- [5] BIB Balai Inseminasi Buatan Lembang. 2017. *SOP Pengolahan Semen Sexing*. Lembang.
- [6] Mardi I, APA Yekti, Kuswati, M Luthfi dan T Susilawati. 2020. Kualitas semen beku sexing sapi peranakan ongole menggunakan volume semen yang berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 7(3) :238-346.
- [7] Lestari SA, Darmawan dan B Rosadi. 2022. Toksikitas gliserol dan kualitas spermatozoa sapi bali post *thawing*. *Majalah Ilmiah Peternakan*, 25(2) :79-84.
- [8] Garner DL dan ESE Hafez. 2008. Spermatozoa and seminal plasma. in: reproduction in farm animal. e. s. e hafez and b. hafez (edit). 7thed. blackwell publishing. australia: 96-109.
- [9] Susilawati T. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.
- [10] Woli SL, ED Kusumawati dan ATN Krisnaningsih. 2017. Motilitas dan viabilitas spermatozoa ayam kampung pada Suhu 5°C menggunakan pengencer dan lama simpan yang berbeda. *Jurnal Sains Peternakan*, 5(2):138-144.
- [11] Suharyantana, B Muwakid dan S Wahjuningsih. 2017. Kualitas semen segar dan recovery rate (RR) sapi limousin pada musim yang berbeda. *J. Ternak Trop*, 18(1):36-50.
- [12] Saili T, Hamzah dan AS Aku. 2014. Kualitas spermatozoa epididimis sapi peranakan ongole (PO) yang disimpan pada suhu 3-5°C. *JITV*, 19(3):1-9.
- [13] Azzahra FY, ET Setiatin dan D Samsudewa . 2016. Evaluasi dan persentase hidup semen segar sapi po kabumen pejantan muda. Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro. Semarang. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*, 11(2) :99-107.
- [14] Garner DL dan ESE Hafez. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In:ESE Hafez (Ed). *Reproduction in farm animal*. 7 th. ed. Lippincott wiliams and wilkins. Philadelphia: 96-106.
- [15] Dewi AS, YS Odho dan E Kurnianto. 2012. Kualitas semen berdasarkan umur pada sapi jantan jawa. *Animal Agriculture journal*, 1(2):126-133.
- [16] Mumu MI. 2009. Viabilitas semen sapi simmental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *J. Agroland*, 16(2):172-179.
- [17] Setiono N, S Sri dan ES Purnama. 2015. Kualitas semen beku sapi brahman dengan dosis krioprotektan gliserol yang berbeda dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*, 3(2):61-69.
- [18] Lestari S, DM Saleh dan Maidaswar. 2013. Profil kualitas semen segar sapi pejantan limousin dengan umur yang berbeda di balai inseminasi buatan lembang jawa barat. *Jurnal Ilmiah Peternakan*, 1(3):1165-1172.
- [19] Dzulqarnaian A, T Saili dan M Rusdin. 2022. Kualitas spermatozoa sapi bali setelah preservasi

menggunakan pengencer tris kuning telur dan madu dengan level yang berbeda. *JIPHO*, 4(3):236-242.

[20] Sali T. 2014. *Pengantar Teknologi Reproduksi*. Tunggal Mandiri. Malang.

[21] Ax RL, MR Dally, BA Didion, RW Lenz, CC Love, DD Varner, B Hafez and ME Bellin. 2008. *Semen Evaluation*. In *Reproductive in Farm Animals*. 8th Edition. Edited by Hafez and Hafez. Lea and Febiger. Pp. 365-375.