

# Pengaruh Lama Ekuilibrasi Terhadap Daya hidup, Motilitas dan Abnormalitas Spermatozoa Beku Sapi Peranakan Ongole (The Effect of Equilibration Duration on Viability, Motility and Abnormality of Frozen Spermatozoa of Ongole Crossbreed Cattle)

Abdes Rijanto<sup>1</sup>, Rahim Aka<sup>1</sup>, Takdir Saili<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Peternakan Universitas Halu Oleo Kendari, Indonesia

takdir69@yahoo.com

**Abstrak.** Waktu ekuilibrasi sangat menentukan kualitas spermatozoa sapi PO pada proses pembekuan semen. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh lama ekuilibrasi terhadap viabilitas, motilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi PO. Materi yang digunakan adalah seekor sapi PO jantan sebagai sumber semen dan spermatozoa yang dievaluasi. Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 kali ulangan. Perlakuan terdiri atas: P1 = Waktu ekuilibrasi selama 2 jam, P2 = Waktu ekuilibrasi selama 3 jam, P3 = Waktu ekuilibrasi selama 4 jam, P4 = Waktu ekuilibrasi selama 5 jam. Variabel yang dievaluasi dalam penelitian ini meliputi kualitas semen (volume, warna, bau, konsistensi dan pH) dan spermatozoa (gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas, viabilitas dan abnormalitas). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata volume sapi PO yang diperoleh adalah 7,63 ml, warna semen putih khas, bau semen khas, konsistensi agak kental-kental, rata-rata pH 6,3, rata-rata konsentrasi spermatozoa adalah 1.360 juta/ml dan gerakan massa ++/+++. Sedangkan rata-rata nilai persentase viabilitas spermatozoa setelah *thawing* untuk P1(62,63%), P2 (69,50%), P3 (79,63%), P4 (78,25), rata-rata persentase motilitas untuk P1 (27,50%), P2 (40,00%), P3 (62,50%), P4 (57,50%), dan rata-rata persentase abnormalitas untuk P1 (2,38%), P2 (2,38%), P3 (1,38%) dan P4 (2,25%). Selanjutnya hasil sidik ragam menunjukkan waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi PO, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa sapi PO. Waktu ekuilibrasi 4-5 jam menghasilkan angka viabilitas dan motilitas spermatozoa sapi PO yang lebih baik dibandingkan waktu ekuilibrasi 2-3 jam.

**Kata Kunci :** Abnormalitas, Ekuilibrasi, Motilitas, PO, Viabilitas.

**Abstract.** The equilibration determines the spermatozoa quality of Ongole Crossbreed (PO) cattle in spermatozoa freezing procedures. This study aimed to examine the effect of equilibration duration on viability, motility and spermatozoa abnormality of PO cattle. The material used was a bull of PO cattle as a source of semen and evaluated spermatozoa. In this study, a completely randomized design (CRD) was used with 4 treatments and 4 replications. The treatments consisted of four different length of equilibration duration namely 2 hours (P1), 3 hours (P2), 4 hours (P3) and 5 hours (P4). The variables evaluated in this study included semen quality (volume, color, odor, consistency and pH) and spermatozoa (mass movement, concentration, percentage of motility, viability and abnormality). The data obtained were analyzed using analysis of variance (ANOVA) and continued with Duncan's test. The results showed that the average volume of PO cattle obtained was 7.63 ml, the color of the semen was characteristic white, the smell of semen was typical, the consistency was slightly thick, the average pH was 6.3, the average concentration of spermatozoa was 1.360 million/ml and the mass movement was ++/+++. While the average value of the percentage of spermatozoa viability after thawing for P1 (62.63%), P2 (69.50%), P3 (79.63%), P4 (78.25), the average percentage of motility for P1 (27.50%), P2 (40.00%), P3 (62.50%), P4 (57.50%), and the mean percentage of abnormality for P1 (2.38%), P2 (2.38%), P3 (1.38%) and P4 (2.25%). Furthermore, the results of variance showed that the equilibration duration had a significant effect ( $P < 0.05$ ) on the viability and motility of spermatozoa of PO cattle, but had no significant effect on spermatozoa abnormality of PO cattle. The equilibration time of 4-5 hours resulted in better spermatozoa viability and motility of PO cattle than the equilibration time of 2-3 hours.

**Keywords:** Abnormality, Equilibration, motility, PO, viability

## 1. Pendahuluan

Salah satu bangsa sapi yang cukup adaptif dengan iklim tropis adalah sapi peranakan ongole (PO). Populasi sapi PO khususnya di wilayah Sulawesi Tenggara masih cukup kecil dibandingkan populasi sapi bali. Namun demikian, persilangan sapi PO dan sapi bali sudah banyak tersebar di wilayah daratan Provinsi Sulawesi Tenggara terutama di Kabupaten Konawe. Persilangan sapi PO dan sapi bali, umumnya dilakukan dengan cara inseminasi buatan atau IB.

Aplikasi IB di lapangan umumnya menggunakan semen beku. Proses pembuatan semen beku terdiri atas beberapa tahap, diantaranya gliserolisasi, ekuilibrisasi, *filling and sealing*, *pre freezing* dan *freezing* [1]. Proses ekuilibrisasi merupakan waktu yang dibutuhkan spermatozoa dalam penyesuaian diri dengan bahan pengencer sebelum dilakukan tahap pembekuan sehingga tingkat kematian spermatozoa dapat diminimalisir akibat pengaruh dari *cool shock*.

Spermatozoa dibiarkan dalam suhu 5°C selama 2 hingga 6 jam agar bisa menyeimbangkan cairan intraseluler dengan *diluter* yang mengandung gliserol sebelum proses pembekuan dimulai ekuilibrisasi [2]. Waktu ekuilibrisasi untuk setiap jenis, bangsa, dan individu pejantan berbeda-beda. Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh lama ekuilibrisasi terhadap daya hidup, motilitas dan abnormalitas spermatozoa sapi PO.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan di Unit Pelaksanaan 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 telah dilaksanakan selama dua bulan dimulai sejak bulan Januari sampai dengan Februari 2021.

### 2.2. Materi

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah satu ekor ternak sapi peranakan ongole jantan berumur 8 tahun dengan berat badan  $\pm$  850 kg yang dipelihara di UPTD Balai Perbibitan dan Pakan Ternak, semen sapi PO, Gliserol, eosin (2%), *aquabidestilata* steril, NaCl fisiologis (0,9%), alkohol (70%), kuning telur, *pennicilin*, *streptomycin*, kertas label, kapas, kertas saring, tissue, korek gas, N<sub>2</sub> cair dan bahan pengencer kuning telur, dan vaselin.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah satu set vagina buatan, tabung penampung semen, thermometer, spektrophotometer, pH meter, labu erlenmeyer, micropipet, gelas ukur, lemari es, *cool top*, aluminium foil, mikroskop, spoit, *cover glass*, kaca preparat, *Counter* dan *beaker glass*.

### 2.3. Metode

Kegiatan diawali dengan penampungan semen yang dilakukan 1 kali dalam satu minggu dengan menggunakan metode vagina buatan (AV) [3]. Tiga hari sebelum penampungan telah dilakukan pembuatan bahan pengencer dengan Langkah awal yang dilakukan yaitu menimbang tris aminomethan sebanyak 7,74 g, asam sitrat 4,34 g, dan fruktosa 3,12, selanjutnya masukkan ketiga bahan ke dalam Erlenmeyer, kemudian menambahkan aquadest sampai 200 ml, kemudian dicampur hingga homogen dengan *magnetic Stirer*. Selanjutnya membuat *buffer antibiotic* (200 ml), langkah awal yang dilakukan yaitu menimbang *streptomycine* 1 g lalu dilarutkan dengan 4 ml aquadest, lalu menimbang penicillin 3 juta IU menambahkan 15 ml *aquabides*, selanjutnya menimbang *buffer* sebanyak 198,2 ml; 0,8 ml *streptomycine*, dan 1 ml *penicillin* kemudian dihomogenkan dengan *magnetic Stirer* [4].

Selanjutnya dilakukan proses pengenceran diawali dengan melakukan pengenceran semen yang diperoleh dengan cara, memberi batas volume pengencer yang diperlukan dengan spidol non permanen dan memberikan label pada gelas ukur sesuai kode perlakuan, lalu menuangkan pengencer part A yang telah disiapkan ke dalam tabung spermatozoa, selanjutnya menggoyangkan gelas ukur agar terjadi larutan semen baru yang homogen, lalu didiamkan selama 35 menit dalam *cool top* (di dalam *water jacket* bersuhu 37°C), kemudian setelah 15 menit kemudian di campur dengan ¼ pengencer part B dan hasil tersebut dilakukan sebanyak 4 kali kedalam gelas ukur. Kemudian Semen yang telah diencerkan selanjutnya diekuilibrisasi pada suhu 4-5°C selama 2-6 jam di dalam *cool top*, penyimpanan 35 menit pertama dalam kondisi 4°C, harus dilengkapi dengan *water jacket* suhu 37°C. setelah waktu yang ditentukan telah berakhir segera Spermatozoa diperiksa dan dilakukan evaluasi meliputi daya hidup, motilitas, dan abnormalitas spermatozoa [5].

Selanjutnya dilakukan proses *filling dan sealing* yang dimana semen dimasukkan ke dalam straw (0.25 ml) dengan menggunakan spuit, kemudian ujung straw dijepit dengan pinset yang telah dipanaskan terlebih dahulu [3]. Setelah dimasukkan dalam straw, selanjutnya dilakukan proses pembekuan uap N<sub>2</sub> cair, dimana straw di masukkan dalam goblet yang ukuran pendek agar proses pembekuan uap berjalan dengan baik pada suhu -110°C, selama 4-5 menit dan 15-20 menit pada suhu -110°C. Setelah itu straw di celupkan dalam *container* yang berisi N<sub>2</sub> cair (suhu -196°C) [6].

Kemudian *Thawing* semen beku dilakukan dengan menggunakan air pada suhu 37°C selama kurang lebih 30 detik. Semen yang telah cair diteteskan pada gelas objek yang telah dihangatkan dan ditutup dengan gelas penutup. Kemudian diamati daya hidup, motilitas, dan abnormalitas spermatozoa [6].

#### 2.4. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 4 kali ulangan. Pengumpulan data meliputi daya hidup, motilitas dan abnormalitas dilakukan setiap tahap evaluasi kualitas spermatozoa. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

P1 = Waktu ekuilibrasi selama 2 jam

P2 = Waktu ekuilibrasi selama 3 jam

P3 = Waktu ekuilibrasi selama 4 jam

P4 = Waktu ekuilibrasi selama 5 jam

#### 2.5. Analisis Data

Data penelitian kemudian dianalisis menggunakan analisis sidik ragam dan jika perlakuan yang dicobakan berpengaruh nyata maka diuji lanjut menggunakan Uji Wilayah Berganda Duncan pada program IBM SPSS Statistics 24.

### 3. Hasil dan Pembahasan

#### 3.1. Evaluasi Semen Segar

Semen segar yang diperoleh dari seekor pejantan sapi peranakan ongole (PO) harus dievaluasi terlebih dahulu baik kualitas semen maupun kualitas spermatozoa, hal ini dilakukan untuk menentukan kelayakan semen segar tersebut sebelum diproses lebih lanjut. Hasil evaluasi semen tersebut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan Karakteristik Semen Segar Sapi Peranakan Ongole

Variabel Pengamatan	Hasil Pengamatan
Volume (ml)	7,63±2,99
Warna	Putih khas
Bau	Khas
Konsistensi	Agak kental – kental
pH	6,3±0,08
Konsentrasi (juta/ml)	1.360±0,16
Gerak massa	++/+++

Volume semen sapi PO yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan cukup tinggi dan masih dalam kisaran normal yaitu (7,63±2,99). Sapi pejantan normalnya menghasilkan rata-rata volume semen 4-8 ml [7]. Warna semen sapi PO yang diperoleh pada penelitian ini adalah putih khas. Warna semen sapi umumnya adalah putih kekuningan atau seperti putih susu yang disebabkan karena adanya *riboflavin* yang mempunyai sifat *autosomal* resesif [8]. Bau semen sapi PO yang diperoleh adalah khas. Hasil penelitian ini menunjukkan masih dalam kondisi normal karena tidak terkontaminasi oleh nanah yang disebabkan adanya infeksi pada saluran reproduksi yang disebabkan oleh luka. semen dengan keadaan normal pada umumnya memiliki bau yang khas [9]. Konsistensi semen sapi PO yang diperoleh pada penelitian ini yaitu agak kental sampai kental. Semakin kental semen dapat diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi spermatozoanya [10]. Rataan nilai pH semen sapi PO adalah 6,30±0,08 Nilai pH semen yang diperoleh pada penelitian ini masih dalam kisaran normal. [11] Derajat keasaman sangat menentukan hidup atau matinya spermatozoa dalam semen. [12] pH semen segar yang digunakan sebagai semen beku berkisar antara 6-7. Rataan konsentrasi spermatozoa dalam penelitian ini adalah 1.360±0,16 juta/ml. [13] Konsentrasi spermatozoa sapi pejantan dipengaruhi oleh besar testis dan frekuensi penampungan semen yang dilakukan. Gerakan massa spermatozoa sapi PO yang diperoleh pada penelitian ini adalah ++/+++ yang dimana terlihat menyerupai awan tebal dengan

pergerakan spermatozoa yang menghasilkan gerakan massa yang menandakan spermatozoa ini masih dalam kategori normal sehingga dapat diproses dan digunakan untuk IB. [14] Gerakan massa spermatozoa sapi rambon yang diperoleh pada penelitian ini rata-rata adalah (+++) yang menandakan spermatozoa bergerak membentuk gelombang besar dan progresif.

### 3.2. Evaluasi Spermatozoa

Hasil evaluasi persentase daya hidup, motilitas dan abnormalitas spermatozoa beku sapi PO Setelah *Thawing* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan Nilai Persentase daya hidup, motilitas dan abnormalitas Spermatozoa Beku Sapi PO Setelah *Thawing*

Variabel	Perlakuan				Rataan Umum
	P1	P2	P3	P4	
Daya Hidup	62,63 <sup>c</sup> ±1,31	69,50 <sup>bc</sup> ±7,49	79,63 <sup>a</sup> ±6,82	78,25 <sup>ab</sup> ±7,79	72,50±9,15
Motilitas	27,50 <sup>c</sup> ±5,00	40,00 <sup>b</sup> ±14,14	62,50 <sup>a</sup> ±5,00	57,50 <sup>a</sup> ±5,00	46,88±16,21
Abnormalitas	2,38±0,48	2,38±1,31	1,38±0,63	2,25±0,87	2,09±0,37

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ ).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap persentase daya hidup spermatozoa beku sapi PO. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan bahwa rataan persentase viabilitas spermatozoa pada perlakuan P3 (79,63%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P1 (62,63%) dan P2 (69,50%), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan P4 (78,25). Hal ini diduga spermatozoa pada waktu ekuilibrasi yang lama cenderung viabilitas spermatozoa lebih optimal disebabkan telah terjadi kestabilan antara elektrolit dengan gliserol secara merata bila dibandingkan dengan waktu ekuilibrasi yang singkat. [15] Spermatozoa hidup pada waktu ekuilibrasi singkat lebih sedikit bila dibandingkan dengan persentase spermatozoa hidup pada waktu ekuilibrasi yang lebih panjang, hal ini disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kematian akibat tekanan penurunan suhu secara cepat tanpa adanya waktu tepat untuk penyesuaian diri terhadap keadaan tersebut. [16] Gliserol membutuhkan waktu yang cukup untuk masuk ke dalam membran sel dan menjaga organel-organel sel dari kerusakan akibat pembekuan spermatozoa. [17] Kualitas spermatozoa di katakan baik jika memiliki jumlah spermatozoa hidup tinggi dan spermatozoa mati  $< 15\%$ .

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap persentase motilitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Selanjutnya hasil uji Duncan menunjukkan bahwa rataan persentase motilitas spermatozoa pada perlakuan P3 (62,50%) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan P1 (27,50%) dan P2 (40,00%), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan P4 (57,50%). Hal ini diduga spermatozoa telah sepenuhnya menyesuaikan diri dengan bahan pengencer dan gliserol setelah 4-5 jam ekuilibrasi sehingga dapat menekan terjadinya kematian spermatozoa akibat *cold shock* pada saat pendinginan. [6] Jika waktu ekuilibrasi dilakukan dengan cepat maka air yang ada di dalam sel akan keluar dalam jumlah sedikit sehingga belum mencapai tahap ekuilibrium, dan apabila dilakukan dengan lambat sel akan mempunyai waktu yang cukup untuk mengeluarkan air dari dalam sel sehingga konsentrasi intrasel meningkat akibatnya sel tidak mengalami pembentukan es intraseluler melainkan hanya terbentuk di luar sel. [18] Pada waktu ekuilibrasi gliserol diberi kesempatan untuk memasuki kepala spermatozoa sebelum pembekuan agar kerusakan mekanis pada spermatozoa dapat dihindari.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan waktu ekuilibrasi tidak berpengaruh nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap persentase abnormalitas spermatozoa sapi PO setelah *thawing*. Angka abnormalitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini berkisar antara 0,50-3,50% dengan rataan umum 2,09%. Nilai ini berada di bawah angka abnormalitas yang dipersyaratkan dalam program inseminasi buatan, yaitu sebesar 10%. [19] Angka persentase abnormalitas semen beku dibawah 10% sesuai dengan SNI semen beku yang masih layak untuk digunakan dalam IB. [20] Semen yang mempunyai abnormalitas 15% tidak dapat digunakan untuk IB.

#### 4. Kesimpulan

Dapat disimpulkan bahwa waktu ekuiliberasi berpengaruh nyata terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi PO, tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa sapi PO. Waktu ekuiliberasi 4-5 jam menghasilkan angka motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi PO yang lebih baik dibandingkan waktu ekuiliberasi 2-3 jam.

#### 5. Daftar Pustaka

- [1] 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. Surabaya.
- [2] Novianto, B. R., Sudarno, dan E.D. Masithah. 2014. Pengaruh perbedaan konsentrasi gliserol dalam susu skim kuning telur untuk proses penyimpanan sperma beku terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 6(1):1-6.
- [3] Apriyanti C. 2012. Pengaruh waktu ekuiliberasi terhadap kualitas semen beku sapi pesisir pre dan post thawing. [Skripsi]. Program Studi Ilmu Ternak Program Pascasarjana Universitas Andalas. Padang.
- [4] Sura, I.W. 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] Kartina. 2014. Pengaruh lama ekuiliberasi terhadap daya hidup spermatozoa kambing peranakan etawah (PE). [skripsi]. Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. Makassar.
- [7] Arifiantini I. 2012. *Teknis Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. Institut Pertanian Bogor (IPB)-Press. Bogor.
- [8] Susilawati T. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Malang: UB Press.
- [9] Kusumawati, E. D., A. T. N. Krisnaningsih, dan A.U. K. Walangara. (2020). Kualitas spermatozoa ayam kampung dan ayam arab dengan lama simpan yang berbeda pada suhu ruang. *Jurnal Sains Peternakan*. 8(1):41-56.
- [10] 2010. *Bioteknologi Reproduksi Pada Ternak*. Alfabeta. Bandung.
- [11] Zulyazaini, Dasrul, S. Wahyuni, M. Akmal, dan M. A. N. Abdullah. 2016. Karakteristik semen dan komposisi kimia plasma seminalis sapi aceh yang dipelihara di BIBD Saree Aceh Besar. *Jurnal Agripet*. 16(2):121-130.
- [12] S. T. 2014. *Reproduksi Aplikatif pada Sapi*. Sri Kandi Widya Utama. Bandung.
- [13] Komariah, R. I. Arifiantini, M. Aun, dan E. Sukmawati. 2020. Kualitas semen segar dan produksi semen beku sapi pejantan madura pada musim yang berbeda. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 8(1):15-21.
- [14] Setyawan, F., T. W. Suprayogi, R. A. Prastiya, T. I. Restiadi, A. L. Saputro, dan B. Agustono. 2019. Pengaruh perbedaan waktu ekuiliberasi sebelum pembekuan terhadap kualitas spermatozoa sapi rambon banyuwangi menggunakan pengencer tris kuning telur. *Jurnal Medik Veteriner*. 2(2): 101-107.
- [15] Muzakkir, Dasrul, S. Wahyuni, M. Akmal, dan M. Sabri. 2017. Pengaruh lama ekuiliberasi terhadap kualitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan menggunakan pengencer andromed. *Jurnal ilmiah peternakan* 5(2): 115-128.
- [16] Febriani, G. D., Hamdan, dan J. Melia. 2014. Pengaruh waktu ekuiliberasi terhadap kualitas semen kerbau lumpur (*Bubalus bubalis*) setelah thawing. *Jurnal Medika Veterinaria*. 8(1):1-4.
- [17] Bintara S. 2011. Rasio X:Y dan kualitas sperma pada kambing kacang dan peranakan ettawa. *Sains Peternakan*. 9(2):65-71.
- [18] Hardijanto S. Suherni, H. Tatik, S. Trilas, dan T. W. Suprayogi. 2010. *Buku Bahan Ajar Inseminasi Buatan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- [19] Ghopa, E., D. Muchlis, D. Fangindae. 2019. Pengaruh suhu pada proses thawing terhadap kualitas spermatozoa sapi PO. *Musamus Journal of Livestock Science*. 2(1):28-32.
- [20] Ax, R. L., M. R. Dally, B. A. Didion, R. W. Lenz, C. C. Love, D. D. Varner, B. Hafez, and M. E. Bellin. 2008. *Semen Evaluation*. In *Reproductive in Farm Animals*. 8<sup>th</sup> Edition. Edited by Hafez and Hafez. Lea and Febiger. Pp. 365-375.