

PENGARUH LAMA SIMPAN SEMEN BEKU SAPI BALI TERHADAP KUALITAS MOTILITAS, VIABILITAS, DAN INTEGRITAS MEMBRAN PLASMA

Tri Sutrisno¹, Sumartono², Sri Susilowati³

¹Program S1 Peternakan, ^{2,3}Dosen Peternakan Universitas Islam Malang

Email: sutrisnot699@gmail.com

Abstrak

Pengaruh lama simpan semen beku Sapi Bali merupakan salah satu dampak dari meningkatnya permintaan daging sapi yang dibekukan. Tujuan penelitian ini, yaitu untuk mengetahui pengaruh lama simpan terhadap motilitas, viabilitas, serta integritas membran plasma pada semen beku sapi Bali. Materi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu semen beku sapi Bali yang telah disimpan selama 4 tahun (produksi 2018), 3 tahun (produksi 2019), dan 2 tahun (produksi 2020) yang tersimpan di Bank Sperma Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. Metode dalam penelitian ini, yaitu metode Studi kasus dengan perlakuan lama penyimpanan semen beku sapi Bali dalam nitrogen cair. Terdapat 3 Perlakuan, perlakuan 1 yaitu lama simpan 2 tahun, perlakuan 2 yaitu lama simpan 3 tahun, dan perlakuan 3 yaitu lama simpan 4 tahun. Tiap-tiap perlakuan diulang sebanyak 6 kali untuk mendapatkan nilai yang akurat. Variabel pengamatan meliputi motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma. Data dianalisis dengan statistik, dan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan uji ANOVA. Jika terdapat perbedaan, maka dilakukan uji lanjut DMRT (Duncan Multiple Range Test) yang kemudian dijelaskan secara deskriptif. Hasil penelitian diperoleh Rata-rata motilitas tertinggi adalah lama simpan 3 tahun yaitu 47,50%, lama simpan 2 tahun sebesar 45,00% dan terendah lama simpan 4 tahun yaitu 41,67%. Rata-rata nilai viabilitas tertinggi adalah lama simpan 2 tahun sebesar 54,00%, lama simpan 4 tahun sebesar 52,50% dan terendah lama simpan 3 tahun 51,17%. Rata-rata nilai integritas membran plasma tertinggi adalah lama simpan 2 tahun sebesar 53,00%, lama simpan 4 tahun sebesar 49,00%, dan terendah lama simpan 3 tahun sebesar 44,50%.

kata kunci: pengaruh lama simpan; semen beku; Sapi Bali; kualitas motilitas; viabilitas; integritas membran plasma.

EFFECT OF SHELF LIFE OF BALINESE CATTLE FROZEN CEMENT ON THE QUALITY OF MOTILITY, VIABILITY, AND INTEGRITY OF PLASMA MEMBRANES

Abstract

The effect of the long storage time of frozen semen for Balinese cattle is one of the impacts of the increasing demand for frozen beef. This study aims to determine the effect of storage time on the motility, viability, and integrity of the plasma membrane in Balinese cattle frozen semen. The material used in this study is Balinese cattle frozen semen that has been stored for 4 years (2018 production), 2 years (2019 production), and 1 year (2020 production) stored in the Sperm Bank of the Singosari Artificial Insemination Center Malang. The method used in this study is an experimental method with long-term treatment of frozen semen storage of Balinese cattle in liquid nitrogen. There are 3 treatments, treatment 1 is a storage period of 2 years, treatment 2 is a storage period of 3 years, and treatment 3 is a storage period of 4 years. Each treatment was repeated 6 times to get accurate results. The variables observed include motility, viability, and integrity of the plasma membrane. Data analysis is analyzed statistically which is then explained descriptively. The results of the study obtained the highest average motility was the 2-year storage age group which was 47.50%, the 1-year storage time group was 45.00% and the lowest 4-year storage age group was 41.67%. The highest average viability value was the 1-year storage time group at 54.00%, the 4-year storage time at 52.50% and the lowest at 2-year storage time at 51.17%. The highest average value of intact plasma membrane was 53.00% in the 1-year storage group, 49.00% in the 4-year storage group, and the lowest in the 2-year storage group at 44.50%.

Keyword: the effect of the storage time; frozen cement; Balinese cattle; quality motility; viability; plasma membrane integrity.

PENDAHULUAN

Pertambahan Jumlah penduduk, serta pendapatan masyarakat Indonesia , dari waktu ke waktu terjadi peningkatan permintaan akan daging sapi . Produksi daging didalam negeri hanya mampu sekitar 65%, sehingga kekurangan tersebut dapat ditutupi oleh daging sapi beku impor sebanyak 20%, dan sapi penggemukan dalam negeri sebesar 15% (Ilham *et al.*, 2015). Perkembangan sapi lokal di Indonesia sangat potensial untuk dikembangkan, dalam rangka terpenuhinya kebutuhan daging nasional.

Sapi Bali merupakan bangsa sapi lokal Indonesia yang memiliki produktivitas, daya adaptasi tinggi terhadap kondisi lingkungan, serta iklim tropis. Sapi Bali adalah bangsa sapi lokal Indonesia yang memiliki produktivitas, daya adaptasi tinggi terhadap kondisi lingkungan, serta iklim tropis. Sapi Bali merupakan ternak asli Indonesia hasil domestifikasi dari banteng (*Bos bibos*) yang memiliki produktivitas, dan kemampuan adaptasi yang baik di iklim tropis. Sapi Bali mempunyai potensi untuk memenuhi kebutuhan protein hewani (Hardjosubroto, 1994). Sapi Bali mempunyai angka kelahiran yang tinggi, dan mampu mencapai 80%, dengan berat lahir berkisar 9-20 kg (Tanari, 2001). Pemerintah telah melaksanakan berbagai program untuk meningkatkan jumlah sapi dan mengurangi impor. Inseminasi Buatan (IB) adalah salah satu program pemerintah untuk meningkatkan produktivitas sapi Bali (Labetubun, 2011).

Teknologi reproduksi yang efektif, serta berpeluang diterapkan di lapangan adalah Inseminasi Buatan (Singh dan Balhara, 2016). Faktor penentu keberhasilan dalam program IB , salah satunya adalah kualitas semen beku yang digunakan. Kualitas semen beku dipengaruhi oleh teknik *Freezing* , bahan pembuatan pengencer, serta kandungan krioprotektan (Ariantje *et al.*, 2013), penanganan semen beku (Janett *et al.*, 2008), serta teknik pencairan atau *thawing* (Al-Badry, 2012).

Selama terendam di nitrogen cair dengan suhu -196 °C, semen beku mampu disimpan dalam jangka waktu yang sangat lama, dan dapat diperuntukkan pada masa yang akan datang (Barbas dan Mascarenhas, 2009). Namun proses kriopreservasi juga memberikan pengaruh buruk terhadap kualitas (Malik *et al.*, 2015) dan fertilitas semen beku (Watson, 2000). Viabilitas dan fertilitas semen beku harus dipertahankan sampai digunakan untuk IB. Kualitas semen beku dapat dipertahankan jika manajemen kontainer dilakukan dengan baik. Manajemen kontainer yang kurang tepat dapat menyebabkan penurunan kualitas semen beku (Loomis dan Squires, 2005). Hal prinsip yang harus diperhatikan dalam *handling* semen beku adalah menjaga agar suhu tetap konstan pada -196 °C. Hal ini dapat dilakukan dengan mengecek dan mengisi ulang nitrogen cair secara berkala. Selain itu perlu dilakukan perawatan dan pemantauan kondisi kontainer secara rutin (Loomis dan Squires, 2005).

Indonesia memiliki dua balai inseminasi buatan nasional yaitu Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, yang berada di wilayah Jawa Barat dan berdiri tahun 1976, serta Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, di Jawa Timur yang berdiri tahun 1982. BBIB Singosari merupakan satu-satunya balai inseminasi buatan nasional yang memproduksi semen

beku sapi Bali. Stok semen beku sapi Bali di BBIB Singosari per Juli 2022 sebanyak 677.459 dosis (BBIB Singosari, 2022). Di kedua balai tersebut saat ini juga masih memiliki straw semen beku sapi yang disimpan selama lebih dari 20 tahun.

Tujuan dari penelitian ini, yaitu untuk mengevaluasi kualitas semen beku yang disimpan dalam jangka waktu lama. Informasi ini diperlukan untuk menjamin bahwa semen beku sapi yang disimpan di balai inseminasi buatan memiliki kualitas yang sesuai dan memenuhi standar minimal yang ditetapkan dalam SNI. 4869.1-2017 Semen Beku Sapi. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi kualitas semen beku sapi Bali, yang disimpan di BBIB Singosari sejak tahun 2018 sampai 2022.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di BBIB Singosari, dan dilaksanakan pada bulan Juli hingga Agustus 2022.

Materi dalam penelitian ini, yaitu semen beku sapi Bali yang telah disimpan selama 4 tahun (produksi 2018), 3 tahun (produksi 2019), dan 2 tahun (produksi 2020), dan tersimpan di Bank Sperma BBIB Singosari, Malang. Metode studi kasus digunakan dalam penelitian ini, dengan perlakuan lama

penyimpanan semen beku sapi Bali dalam nitrogen cair yaitu ada 3 perlakuan, perlakuan 1 dengan lamanya simpan 2 tahun, perlakuan 2 dengan lamanya simpan 3 tahun, dan perlakuan 3 dengan lamanya simpan 4 tahun. Tiap-tiap perlakuan, diulang sebanyak 6 kali, untuk mendapat nilai yang akurat. Variabel pengamatan meliputi motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma.

Prosedur Penelitian

Penelitian ini, dilakukan dengan mengevaluasi kualitas semen beku dengan lama penyimpanan yang berbeda. Pemeriksaan kualitas semen beku dilakukan secara mikroskopis dengan parameter yaitu: motilitas, viabilitas, serta integritas membran plasma.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan uji ANOVA. Jika terdapat perbedaan, maka dilakukan uji lanjut DMRT (Duncan Multiple Range Test). Software SPSS 16.0 for Windows, digunakan dalam menganalisis data

HASIL DAN PEMBAHASAN

Motilitas

Hasil pengamatan diperoleh data rata-rata kualitas motilitas Semen beku sebagai berikut:

Tabel 1. Kualitas Semen beku dengan berbagai lama simpan

TAHUN	Ulangan						Rata-rata
	1	2	3	4	5	6	
2 Tahun	55	45	45	45	35	45	45,00 ^a
3 Tahun	50	40	50	40	50	55	47,50 ^a
4 Tahun	40	45	45	40	40	40	41,67 ^a

Superskrip pada kolom yang sama, menunjukkan tidak ada perbedaan ($P > 0,05$)

Berdasarkan hasil evaluasi sebagaimana ditampilkan Tabel. 3, diketahui bahwa rata-rata motilitas semen beku sapi Bali yang disimpan selama 2, 3, dan 4 tahun di Bank Sperma BBIB Singosari tidak berbeda nyata.

Viabilitas

Hasil pengamatan diperoleh data rata-rata kualitas viabilitas semen beku sebagai berikut:

Tabel 2. Kualitas semen beku dengan berbagai lama simpan sebagai berikut:

TAHUN	ULANGAN						RATA-RATA
	1	2	3	4	5	6	
2 Tahun	53	54	55	53	53	55	54,00 ^b
3 Tahun	52	50	53	51	52	49	51,17 ^a
4 Tahun	50	55	52	53	54	51	52,50 ^{ab}

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama, menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$)

Berdasarkan evaluasi sebagaimana ditampilkan pada Tabel 3 diketahui bahwa nilai rata-rata viabilitas semen beku sapi Bali yang disimpan selama 2, 3, dan 4 tahun di Bank Sperma BBIB Singosari terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$).

Integritas Membran Plasma

Hasil pengamatan diperoleh data rata-rata kualitas integritas membran plasma semen beku sebagai berikut

:

Tabel 3. Kualitas semen beku dengan berbagai lama simpan

TAHUN	ULANGAN						RATA-RATA
	1	2	3	4	5	6	
2 Tahun	52	54	53	53	52	54	53,00 ^c
3 Tahun	44	45	44	45	43	46	44,50 ^a
4 Tahun	48	50	49	51	48	48	49,00 ^b

Superskrip yang berbeda, pada kolom yang sama, menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$)

Berdasarkan evaluasi sebagaimana ditampilkan Tabel. 5 diketahui bahwa nilai rata-rata integritas membran plasma semen beku sapi Bali yang telah disimpan selama 2, 3, dan 4 tahun di Bank Sperma BBIB Singosari terdapat perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

Motilitas

Keberhasilan program inseminasi buatan dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu kualitas semen beku, ketepatan deteksi birahi, penanganan semen beku, dan keterampilan petugas inseminator (Vincent *et al.*, 2012; Lieberman *et al.*, 2016). Balai Inseminasi Buatan (BIB) sebagai produsen semen beku bertanggungjawab menjamin ketersediaan semen beku berkualitas untuk menghasilkan angka kebuntingan yang tinggi. Untuk menjamin kualitas semen beku yang diproduksi oleh BIB di Indonesia maka Badan Standardisasi Nasional (BSN) menetapkan standar kualitas untuk semen beku sapi yang dituangkan dalam Standar Nasional Indonesia (SNI) Semen Beku Sapi 4869.1.2017. Sebagaimana standar tersebut motilitas minimal semen beku sapi adalah 40%, gerak individu minimal (++) dan konsentrasi minimal 25 juta spermatozoa/0,25 ml.

Berdasarkan hasil evaluasi yang telah dilakukan diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan motilitas semen beku sapi Bali yang disimpan selama 2 tahun, 3 tahun dan 4 tahun di Bank Sperma BBIB Singosari. Agar diperoleh angka kebuntingan (*conception rate*) yang tinggi maka nilai motilitas pasca thawing minimal yang direkomendasikan adalah 40% (Zewdie *et al.*, 2005), viabilitas pasca thawing minimal adalah 40% (Morrell *et al.*, 2018), dan integritas membran plasma minimal 40% (Pardede *et al.*, 2020).

Berdasarkan hasil evaluasi diketahui nilai rata-rata motilitas pasca thawing pada penyimpanan 2 tahun sebesar 45,00%, 3 tahun sebesar 47,50%, dan 4 tahun sebesar 41,67%. Berdasarkan hasil uji statistik tidak terdapat perbedaan nyata pada ketiga lama penyimpanan tersebut. Ketiganya menunjukkan nilai >40% yang merupakan standar minimal yang ditetapkan dalam SNI Semen Beku Sapi. Motilitas spermatozoa

merupakan parameter penting dalam mengevaluasi potensi fertilitas sapi pejantan. Motilitas berkaitan erat dengan kerusakan DNA dan berperan penting dalam proses fertilisasi (Puglisi *et al.*, 2017). Spermatozoa yang tidak bergerak atau *immotile* merupakan indikator infertilitas pada sapi pejantan (Longobardi *et al.*, 2017). Kemampuan spermatozoa bergerak dalam saluran reproduksi betina menuju oosit sangat penting untuk keberhasilan proses fertilisasi. Pergerakan ini bergantung pada keaktifan dari flagel spermatozoa (Yoon *et al.*, 2022). Keaktifan flagel spermatozoa ditentukan oleh fungsi mitokondria yang menghasilkan energi dengan memecah *Adenosin Triphosphat* (ATP) menjadi *Adenosin Diphosphat* (ADP) (Barbagallo *et al.*, 2020).

Viabilitas

Hasil evaluasi nilai rata-rata viabilitas pasca thawing pada lama penyimpanan 2 tahun, yaitu sebesar 54,00%, 3 tahun yaitu 51,17% dan 4 tahun yaitu 52,50%. Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan perbedaan nyata viabilitas semen beku yang disimpan selama 2 dan 3 tahun. Nilai viabilitas paling tinggi diperoleh pada lama simpan 2 tahun, dan paling rendah pada lama simpan 3 tahun. Namun demikian semua nilai viabilitas pada ketiga tersebut masih di atas nilai minimum yang ditetapkan sebesar 40% (Morrell *et al.*, 2018). Evaluasi viabilitas spermatozoa pasca thawing dilakukan menggunakan pewarnaan eosin-nigrosin. Sel Spermatozoa yang mati, ditandai dengan warna ungu gelap pada kepala sel. Sedangkan sel spermatozoa yang masih hidup, ditandai dengan kapala berwarna terang transparan. Pada sel spermatozoa yang mati terjadi peningkatan permeabilitas membran, sehingga pewarna eosin-nigrosin dapat masuk dengan mudah dan mewarnai sitoplasma sel spermatozoa. Sel spermatozoa yang masih hidup memiliki

warna transparan karena pewarna sulit menembus membran spermatozoa yang masih memiliki permeabilitas membran yang baik (Prabowo *et al.*, 2021). Beberapa faktor yang mempengaruhi viabilitas spermatozoa adalah fluktuasi suhu, lama penyimpanan, metabolisme sel, dan ketersediaan nutrisi (Munazaroh *et al.*, 2013).

Integritas Membran Plasma

Hasil evaluasi nilai rata-rata integritas membran plasma pasca *thawing* pada lama penyimpanan 2 tahun, yaitu 53,00%, 3 tahun yaitu 44,50% dan 4 tahun yaitu 49,00%. Berdasarkan hasil analisis statistik, menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada ketiga lama penyimpanan. Nilai integritas membran plasma pada ketiga tersebut masih diatas nilai minimum yang ditetapkan sebesar 40% (Pardede *et al.*, 2020). Evaluasi integritas membran plasma, menggunakan metode *Hypo-Osmotic Swelling Test* (HOST). Membran plasma yang utuh merupakan indikator kemampuan fertilisasi spermatozoa karena perannya yang berkaitan dengan proses kapasitas, reaksi akrosom, serta penyatuan spermatozoa dengan sel telur. Metode HOS tes menilai keutuhan membran plasma dengan cara melihat kemampuan membran untuk mempertahankan keseimbangan osmotik antara sitoplasma dengan lingkungan. Spermatozoa yang terpapar dalam larutan hipo-osmotik menyebabkan kondisi sitoplasma menjadi hiperosmotik. Hal ini menyebabkan sel akan menyerap air dari lingkungan ke dalam sitoplasma untuk mencapai keseimbangan osmotik. Spermatozoa yang memiliki membran plasma yang utuh akan mengalami pembengkakan atau *coil* pada ekornya. Pada sel spermatozoa dengan membran plasma yang tidak utuh, tidak akan menunjukkan respon, dan tidak terjadi perubahan bentuk (Remu dan Jayendran, 2012).

Beberapa laporan terkait pengaruh lama penyimpanan terhadap kualitas semen beku menyatakan hasil yang kontradiktif. Ramirez *et al.* (2016) bahwa, tidak adanya perbedaan pada motilitas, viabilitas dan integritas akrosom sel spermatozoa sapi yang telah disimpan dalam jangka waktu 45, 40, 25, 10, dan 1 tahun. Menurut Huang *et al.* (2019), bahwa masa simpan tidak berpengaruh terhadap integritas DNA, dan fertilitas pada sel spermatozoa manusia. Berbeda dengan laporan tersebut, beberapa penelitian lainnya justru menyatakan bahwa lama penyimpanan berpengaruh terhadap kualitas semen beku. Lama simpan semen beku berpengaruh terhadap penurunan keutuhan membran plasma, fungsi mitokondria dan fertilitas serta meningkatkan angka *non-return rate* pada spermatozoa sapi (Haugan *et al.*, 2007; Malik *et al.*, 2015) dan babi (Li *et al.*, 2018). Penelitian lain juga melaporkan terjadinya peningkatan fragmentasi DNA pada spermatozoa babi yang disimpan dalam nitrogen cair pada waktu yang lebih lama (Fraser *et al.*, 2014).

Manajemen kontainer dan handling semen beku juga berpengaruh terhadap kualitas semen beku selama penyimpanan. Fertilitas semen beku akan menurun jika terjadi perubahan suhu selama penyimpanan (Loomis dan Squires, 2005). Apabila selama penyimpanan terjadi kenaikan suhu hingga mencapai -80°C , akan mengakibatkan terjadinya pembentukan kristal (rekristalisasi) di dalam sel, dan dapat merusak membran spermatozoa (Bojic *et al.*, 2021). Salah satu titik kritis yang dapat menurunkan kualitas semen beku adalah pada saat pemindahan dan penghitungan. Semen beku yang terpapar suhu ruang pada waktu yang singkat dapat menyebabkan

fluktuasi suhu yang signifikan di dalam straw. Hal ini akan berdampak buruk terhadap kualitas semen beku. Apabila pemindahan straw dilakukan secara bertahap maka straw yang tertinggal di kanister kemungkinan mengalami akumulasi paparan suhu ruang yang menyebabkan kerusakan permanen dan penurunan fertilitas spermatozoa (Lieberman *et al.*, 2016).

Tidak terdapat perbedaan yang nyata pada hasil penelitian ini, dan nilai rata-rata motilitas semen beku sapi Bali yang disimpan selama 2, 3, dan 4 tahun. Namun terdapat perbedaan nyata pada nilai rata-rata viabilitas dan integritas membran plasma semen beku sapi Bali pada lama simpan 2, 3, dan 4 tahun di Bank Sperma BBIB Singosari. Walaupun demikian seluruh parameter kualitas semen beku yang dievaluasi memenuhi standar minimal yang ditetapkan.

KESIMPULAN

Lama simpan semen beku sapi Bali terhadap kualitas motilitas, viabilitas, dan integritas membran plasma, didapatkan bahwa tidak adanya perbedaan motilitas semen beku Sapi Bali, pada lama simpan 2, 3, dan 4 tahun pada semen beku Sapi Bali pada pemeriksaan motilitas. Pengujian motilitas dalam penyimpanan > 40%, masih memenuhi SNI. 886-1: 2017. Nilai rata-rata viabilitas semen beku sapi Bali, pada lama simpan 2, 3, dan 4 tahun terdapat perbedaan. Nilai rata-rata integritas membran plasma semen beku sapi Bali pada lama simpan 2, 3, dan 4 tahun menunjukkan perbedaan. Selain itu, seluruh parameter kualitas semen beku yang dievaluasi memenuhi standar minimal yang ditetapkan.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Badry KI. 2012. *Effect of Various Thawing Times and Temperatures on Frozen Semen Quality of*

Friesian Bulls in Iraq. Int J Anim Veter Adv, 4(6): 384-388.

Ariantie OS, Yusuf TL, Sajuthi D, dan Arifiantini RI. 2013. Pengaruh Krioprotektan Gliserol dan Dimethylformamida dalam Pembekuan Semen Kambing Peranakan Etawa menggunakan Pengencer Tris Modifikasi. *JITV*. 18:239-250.

Arifiantini RI, B Purwantara, TL Yusuf dan D Sajuthi. 2009. Peranan Fruktosa, Raffinosa dan Trehalosa pada Kriopreservasi Semen Kuda. *Media Peternakan*. 32(3) : 171-178.

Arifiantini RI. 2012. *Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan*. IPB Press. Bogor.

Asturiano JF. 2007. *Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. Reprod Domest Anim* (42):162-166.

Anonimus. 2017. Semen Beku Sapi. SNI. BSN. Jakarta.

Barbagallo F, S La Vignera, R Cannarella, A Aversa, AE Calogero, and RA Condorelli. 2020. *Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. Journal of Clinical Medicine*. 9 (363): 1-12.

Barbas JP and Mascarenhas RD. 2009. *Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. Cell Tiss Bank*. 10(1):49-62.

Barth A D and Oko RJ. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. USA: Iowa State University Press.

Anonimus 2022. Stok Semen Beku. <https://bbibsingosari>.

-
- ditjenpkh.pertanian.go.id/produk/#1603333602951-0ce5735c-a7e7. Diakses pada 10 Agustus 2022.
- Björndahl L, I Soderlund, S Johansson, M Mohammadieh, MR Pourian, and U Kvist. 2004. *Why The WHO Recommendation for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change*. *J Androl*. 25(5): 671– 678.
- Bojic S, Murray A, Bentley BL, Spindler R, Pawlik P, Cordeiro JL, Bauer R, and Magalhaes JP. 2021. *Winter Is Coming: The Future of Cryopreservation*. *BMC Biology*. 19(56).
- Fraser L, Strzezek J, and Kordan W. 2014. *Post-thaw Sperm Characteristics Following Long-Term Storage of Boar Semen in Liquid Nitrogen*. *Animal Reproduction Science*. 147(3): 119–127.
- Gardner DK, Weissman A, Howless M, and Shoham Zeev. 2001. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives*. United Kingdom: Martin Dunitz Ltd.
- Garner DL dan ESE Hafez. 2000. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. Di dalam: B Hafez, ESE Hafez, editor. *Reproduction in Farm Animals 7th edition*. Lippincott Williams. Philadelphia.
- Hardjosubroto, W. 1994. *Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan*. PT Grasindo. Jakarta.
- Haugan T, Grohn YT, Kommisrud E, Ropstad E, and Reksen O. 2007. *Effects of Sperm Concentration at Semen Collection and Storage Period of Frozen Semen on Dairy Cow Conception*. *Animal Reproduction Science*. 97(1): 1–11.
- He S, Woods C. 2004. *Changes in Motility, Ultrastructure, and Fertilization Capacity of Striped Bass Morone Saxatilis Spermatozoa Following Cryopreservation*. *Aquaculture* 236(2) : 677–686.
- Huang C, Lei L, Wu HL, Gan RX, Yuan XB, Fan LQ, and Zhu WB. 2019. *Long-Term Cryostorage of Semen in A Human Sperm Bank Does Not Affect Clinical Outcomes*. *Fertility and Sterility*. 112(4): 663-669.
- Ilham N, Saptana, A Purwoto, Y Supriyatna, dan T Nurasa. 2015. *Kajian Pengembangan Industri Peternakan Menu dukung Peningkatan Produksi Daging*. Pusat Sosial Ekonomi dan Kebijakan Pertanian, Balitbangtan.
- Indriani, T Susilawati, S Wahyuningsih. 2013. *Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Metode Water Jacket dan Free Water Jacket*. *Jurnal Veteriner*. 14(3) : 379-386.
- Ismaya. 2014. *Bioteknologi Inseminasi Buatan pada Sapi dan Kerbau*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Janett F, Schilter E, Weber F, Witschi U, and Thun R. 2008. *Effects of Straw Handling During Storage on Semen Quality in The Bull*. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 150(12) : 591-597.
- Jeyendran RS, HH Van der ven, M Perez-Pelaez, BG Crabot, and LJD Zaneveld. 1984. *Development of An Assay to Assess The Functional Integrity of The Human Sperm Membran and Its Relationship to Other Semen Characteristics*.
-

-
- Journal Fertility and Sterility*. 70: 219-225.
- Kementan. 2010. *Sapi Bali*. [Http://bibit.ditjenpkh.pertanian.go.id/ content/sapi-bali](http://bibit.ditjenpkh.pertanian.go.id/content/sapi-bali). Diakses pada 5 April 2022
- Labetubun J dan IP Siwa. 2011. Kualitas Spermatozoa Kauda Epididimis Sapi Bali dengan Penambahan Laktosa atau Maltosa yang Dipreservasi pada suhu 3–5°C. *Jurnal Veteriner*. (12)3: 200-207.
- Li J, Parrilla I, Ortega MD, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H, and Roca J. 2018. *Post-Thaw Boar Sperm Motility Is Affected By Prolonged Storage of Sperm in Liquid Nitrogen*. A retrospective study. *Cryobiology*. 80: 119–125.
- Lieberman D, E McClure, S Harston, and D Madan. 2016. *Maintaining Semen Quality By Improving Cold Chain Equipment Used in Cattle Artificial Insemination*. *Scientific Report*. 6, 28108.
- Longobardi V, Salzano A, Campanile G, Marrone R, Palumbo F, Vitiello M, and Gasparini B. 2017. *Carnitine Supplementation Decreases Capacitation-Like Changes Of Frozen-thawed Buffalo Spermatozoa*. *Theriogenology*. 88(1): 236-243.
- Loomis PR and Squires EL. 2005. *Frozen Semen Management in Equine Breeding Programs*. *Theriogenology*. 64(3):480-491.
- Malik A, Laily M, dan Zakir MI. 2015. *Effects Of long-term storage of semen in liquid nitrogen on the viability, motility and abnormality of frozen thawed Frisian Holstein Bull Spermatozoa*. *Asian Pac J of Rep*. 4(1):22-25.
- Morrell JM, AS Valeanu, N Lundeheim, and A Johannisson. 2018. *Sperm Quality in Frozen Beef And Dairy Bull Semen*. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 60(1):41.
- Munazaroh AM, Wahyuningsih S, dan Ciptadi G. 2013. Uji Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Hasil Pembekuan Menggunakan Mr Frosty pada Tingkatan Pengenceran Andromed Berbeda. *Jurnal Ternak Tropika*. 14(2) : 63-71.
- Pardede BP dan Supriatna I. Agil M. 2020. *Protamine and Other Proteins in Sperm and Seminal Plasma As Molecular Markers of Bull Fertility*. *Veterinary World*. 13(3): 556-562.
- Prabowo RWAS. 2021. Pengaruh Jenis Medium Pengencer Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Melalui Pemeriksaan Viabilitas, Membran Plasma Utuh dan Tudung Akrosom Utuh Spermatozoa. Skripsi Universitas Brawijaya Malang.
- Ramírez AR, Hernández JL, and Aros P. 2016. *Long-Term Storing of Frozen Semen at 196° C Does Not Affect The Post-Thaw Sperm Quality of Bull Semen*. *Cryopreservation in Eukaryotes InTech*. p. 91-102.
- Ramu S and Jayendran RS. 2012. *The Hypo-Osmotic Swelling Test for Evaluation of Sperm Membrane Integrity*. di dalam: Carrel DT, Aston KI, Editor, *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. Springer Science Media.
- Singh I and Balhara AK. 2016. *New Approaches in Buffalo Artificial Insemination Programs With*
-

- Special Reference to India. Theriogenology.* 86(1):1-6.
- Susilawati T. 2011. *Spermatologi.* Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Tanari M. 2001. Usaha Pengembangan Sapi Bali Sebagai Ternak Lokal dalam Menunjang Pemenuhan Kebutuhan Protein Asal Hewani di Indonesia.
[Http://rudyc2.250x.com/sem1_012/m_tanari.htm](http://rudyc2.250x.com/sem1_012/m_tanari.htm). Diakses pada 10 Agustus 2022.
- Vincent P, Underwood SL, Dolbec C, Bouchard N, Kroetsch T, and Blondin P. 2012. *Bovine Semen Quality Control in Artificial Insemination Centers.* *Jurnal Animal Reproduction.* 9(3):153-165.
- Yogev L, SE Kleiman, E Shabtai, A Botchan, G Paz, R Hauser, O Lehavi, and H Yavetz. 2010. *Long-Term Cryostorage of Sperm in A Human Sperm Bank Does Not Damage Progressive Motility Concentration.* *Human Reproduction*, 25(5): 1097-1103.
- Yoon JW, SE Lee, WJ Kim, DC Kim, CH Hyun, SJ Lee, HJ Park, SH Kim, SH Oh, DG Lee, DB Pyeon, EY Kim, and SP Park. 2022. *Evaluation of Semen Quality of Jeju Black Cattle (JBC) to Select Bulls Optimal for Breeding and Establish Freezing Conditions Suitable For JBC Sperm. Animals.* 12(5):535.
- Zenichiro K, Herliantien, dan Sarastina. 2002. *Practical Instruction. Technology of Frozen Semen Processing For Cattle.* Publisher by Artificial Insemination Center. Singosari. BBIB. Malang.
- Zewdie E, Deneke N, Fikre-Mariam D, Chaka E, Haile-Mariam D, and Mussa A. 2005. *Guidelines and Procedures On Bovine Semen Production.* NAIC, Addis Ababa.