

HUBUNGAN ANTARA LAMA WAKTU PENYIMPANAN DENGAN KUALITAS SEMEN SEGAR SAPI BALI PADA SUHU 37°C–38°C

M. Rizky Fajar Novanda¹, Nisa'us Sholikhah², Sumartono²

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan, Universitas Islam Malang

²Dosen Peternakan Universitas Islam Malang

Email : 22101041045@unisma.ac.id

Abstrak

Penelitian ini bertujuan menganalisis pengaruh lama penyimpanan semen segar sapi Bali pada suhu fisiologis 37–38°C terhadap kualitas spermatozoa, meliputi motilitas individu, viabilitas, dan abnormalitas. Penelitian dilakukan pada 2–22 Juli 2025 di BRMP Grati, Pasuruan, Jawa Timur, menggunakan semen segar dari satu ekor sapi Bali pejantan berumur empat tahun dengan motilitas minimal 70% dan konsistensi normal. Perlakuan terdiri atas empat kelompok waktu penyimpanan, yaitu 0 menit (kontrol), 15 menit, 30 menit, dan 45 menit, dengan parameter yang diamati meliputi motilitas individu, viabilitas, serta abnormalitas spermatozoa. Analisis korelasi dan regresi linier sederhana menunjukkan bahwa lama penyimpanan berhubungan negatif dengan motilitas individu ($r = -0,326$; $r^2 = 0,11$; $P > 0,05$) dan viabilitas ($r = -0,507$; $r^2 = 0,26$; $P < 0,05$), serta berhubungan positif dengan abnormalitas ($r = 0,197$; $r^2 = 0,04$; $P > 0,05$). Viabilitas terbukti menjadi parameter paling sensitif dengan penurunan rata-rata 0,1592% per menit penyimpanan, sedangkan motilitas dan abnormalitas relatif lebih stabil hingga 45 menit. Disimpulkan bahwa penyimpanan semen segar pada suhu fisiologis berpengaruh signifikan terhadap viabilitas, namun tidak terhadap motilitas maupun abnormalitas.

Kata Kunci : Sapi Bali, Semen segar, Lama penyimpanan, Kualitas spermatozoa

Correlation Between Storage Time and Fresh Semen Quality of Bali Bull at 37°C–38°C

Abstract

This study aimed to analyze the effect of storage duration of fresh Bali bull semen at physiological temperature (37–38°C) on spermatozoa quality, including individual motility, viability, and abnormality. The research was conducted on July 2–22, 2025, at the Agricultural Assembly and Modernization Agency (BRMP) Grati, Pasuruan, East Java, using fresh semen collected from a four-year-old Bali bull with a minimum individual motility of 70% and normal consistency. The treatments consisted of four storage times: 0 minutes (control), 15 minutes, 30 minutes, and 45 minutes, with observed parameters including individual motility, viability, and abnormality of spermatozoa. Correlation and simple linear regression analyses showed that storage duration was negatively correlated with individual motility ($r = -0.326$; $r^2 = 0.11$; $P > 0.05$) and viability ($r = -0.507$; $r^2 = 0.26$; $P < 0.05$), while it was positively correlated with abnormality ($r = 0.197$; $r^2 = 0.04$; $P > 0.05$). Viability was identified as the most sensitive parameter, with an average decline of 0.1592% per minute of storage, whereas motility and abnormality remained relatively stable up to 45 minutes.. It can be concluded that storage duration at physiological temperature significantly affects semen viability but not individual motility or abnormality.

Keywords: Bali bull, Fresh semen, Storage duration, Spermatozoa quality

PENDAHULUAN

Sapi Bali (*Bos sondaicus*) merupakan salah satu plasma nutfah asli Indonesia yang memiliki peranan penting sebagai sumber protein hewani nasional. Ternak ini dikenal memiliki keunggulan berupa kemampuan adaptasi tinggi terhadap lingkungan tropis, efisiensi pemanfaatan pakan yang baik, serta

performa reproduksi yang relatif optimal (Budhi *et al.*, 2016). Keunggulan tersebut menjadikan sapi Bali sangat potensial untuk dikembangkan sebagai sumber daya genetik sekaligus mendukung ketahanan pangan nasional. Dalam rangka meningkatkan produktivitas dan mutu genetik sapi Bali, berbagai teknologi reproduksi modern telah diterapkan, salah satunya

inseminasi buatan (IB). IB merupakan metode reproduksi yang efektif dalam mempercepat peningkatan populasi dan perbaikan mutu genetik ternak, namun keberhasilannya sangat ditentukan oleh kualitas semen yang digunakan.

Kualitas semen, baik beku maupun segar, ditentukan oleh beberapa parameter penting, di antaranya motilitas, viabilitas, dan morfologi spermatozoa. Dalam praktik lapangan, semen segar sering digunakan karena proses aplikasinya lebih sederhana, efisien, dan tidak membutuhkan fasilitas penyimpanan khusus seperti semen beku. Akan tetapi, semen segar memiliki keterbatasan utama, yaitu daya simpannya yang relatif singkat. Menurut Tania *et al.* (2019), kualitas semen segar sangat dipengaruhi oleh durasi penyimpanan sebelum diaplikasikan untuk inseminasi atau diproses lebih lanjut.

Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penyimpanan semen dalam jangka waktu tertentu dapat menurunkan kualitas spermatozoa. Pada suhu fisiologis 37–38°C, aktivitas metabolisme spermatozoa tetap berlangsung sehingga penyimpanan yang terlalu lama berpotensi mempercepat kerusakan sel. Varasofiari *et al.* (2013) melaporkan bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi menurun signifikan setelah penyimpanan selama 2–3 jam pada suhu fisiologis. Lebih lanjut, Prastika *et al.* (2018) menegaskan bahwa motilitas merupakan indikator utama kualitas semen karena secara langsung berkaitan dengan kemampuan sperma membuahi sel telur. Penurunan motilitas akibat penyimpanan yang terlalu lama akan berimplikasi pada rendahnya peluang keberhasilan fertilisasi. Penelitian oleh Ducha *et al.* (2013) juga memperlihatkan bahwa viabilitas dan morfologi spermatozoa menurun seiring bertambahnya waktu penyimpanan meskipun ditambahkan pengencer, sehingga semakin menegaskan pentingnya pengendalian faktor waktu dalam menjaga kualitas semen segar.

Hingga saat ini kajian mengenai pengaruh lama penyimpanan semen segar pada suhu fisiologis terhadap kualitas spermatozoa sapi Bali masih terbatas. Padahal, informasi ini sangat penting dalam praktik lapangan, khususnya di unit pelaksana teknis IB maupun peternakan rakyat yang menggunakan semen segar. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk menganalisis hubungan antara durasi penyimpanan semen pada suhu 37–38°C dengan kualitas semen segar sapi Bali, meliputi

motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa.

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi ilmiah mengenai batas waktu optimal penyimpanan semen segar sebelum digunakan atau diproses lebih lanjut. Temuan tersebut dapat menjadi acuan praktis dalam pengelolaan reproduksi, baik bagi akademisi, peternak, maupun lembaga terkait, sehingga dapat meningkatkan efisiensi reproduksi dan keberhasilan program IB. Lebih jauh, penelitian ini diharapkan dapat berkontribusi pada strategi peningkatan produktivitas sapi Bali secara berkelanjutan serta mendorong pemanfaatan plasma nutfah lokal dalam pembangunan peternakan nasional.

MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 2–22 Juli 2025 di Badan Perakitan dan Modernisasi Pertanian (BRMP) Grati, Pasuruan, Jawa Timur. Materi penelitian berupa semen segar dengan motilitas minimal 70% yang diperoleh dari lima ejakulat seekor pejantan sapi Bali berumur empat tahun. Bahan yang digunakan meliputi larutan NaCl fisiologis 0,9%, aquades, air hangat bersuhu 37–38°C, pewarna eosin-nigrosin, serta alkohol 70%. Peralatan penelitian terdiri atas vagina buatan, tabung penampung semen, mikroskop, mikropipet, object glass, cover glass, hemositometer, serta perlengkapan laboratorium pendukung lainnya. Seluruh bahan dan peralatan digunakan untuk mengevaluasi kualitas semen secara makroskopis dan mikroskopis.

Metode penelitian menggunakan pendekatan observasional kuantitatif dengan empat perlakuan waktu penyimpanan, yaitu 0 menit (kontrol), 15 menit, 30 menit, dan 45 menit, masing-masing diamati pada lima ejakulat ($n=5$). Parameter yang diamati mencakup motilitas individu, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa. Motilitas diamati dengan mikroskop pada sedikitnya lima bidang pandang, sedangkan viabilitas ditentukan dengan pewarnaan eosin-nigrosin, dan abnormalitas dihitung berdasarkan persentase kelainan primer maupun sekunder pada minimal 200 spermatozoa. Data hasil pengamatan dianalisis menggunakan korelasi dan regresi linier sederhana untuk mengetahui hubungan antara lama penyimpanan semen dengan kualitas spermatozoa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Antara Lama Waktu Penyimpanan dengan Motilitas Individu pada Duhu 37° C - 38°C

Hasil penelitian menunjukkan adanya hubungan negatif antara lama penyimpanan dengan motilitas individu spermatozoa, yaitu semakin lama waktu penyimpanan maka semakin rendah persentase motilitas. Nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,326 termasuk kategori lemah, dan secara statistik tidak signifikan ($P > 0,05$). Hal ini mengindikasikan bahwa faktor lama penyimpanan bukan satu-satunya variabel yang menentukan penurunan motilitas, melainkan terdapat faktor lain yang lebih dominan.

Tabel 1. Hubungan Antara Lama Waktu Penyimpanan Terhadap Motilitas Individu, Viabilitas, dan Abnormalitas Spermatozoa

Varia bel	r	r ²	Persamaan regresi	Signifika nsi
Motili tas indivi du	-0,326	0,11	$Y = 79,436x - 0,0863x$	($P > 0,05$)
Viabil itas	-0,507	0,26	$Y = 88,053 - 0,1592x$	($P < 0,05$)
Abnor malita s	-0,197	0,04	$Y = 2,5173 + 0,0172x$	($P > 0,05$)

Menurut Sumardani *et al.* (2021), motilitas spermatozoa sangat bergantung pada spesies, kondisi fisiologis, dan status reproduksi, sedangkan Purnomo *et al.* (2019) menambahkan bahwa umur pejantan, status kesehatan, manajemen nutrisi, kualitas pakan, teknik pengambilan semen, suhu lingkungan, serta penanganan pasca-pengambilan seperti pengenceran, pendinginan, dan pembekuan, merupakan faktor penting yang memengaruhi motilitas spermatozoa.

Koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,11 menunjukkan bahwa lama penyimpanan pada suhu fisiologis 37–38°C hanya berkontribusi sebesar 11% terhadap variasi motilitas individu, sementara 89% sisanya dipengaruhi faktor lain. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun suhu penyimpanan mendekati kondisi tubuh sapi, mekanisme metabolisme seluler tetap berjalan dan menyebabkan penurunan kualitas semen seiring waktu. Pada suhu fisiologis tersebut, spermatozoa relatif mampu mempertahankan integritas membran plasma, kestabilan enzim, dan keseimbangan osmotik, sehingga motilitas dapat bertahan pada periode tertentu (BSN, 2021). Suharyono *et al.* (2017) juga menjelaskan bahwa penyimpanan semen pada suhu yang sesuai mampu menjaga viabilitas, menekan

kerusakan oksidatif, dan mendukung potensi fertilisasi yang optimal.

Berdasarkan persamaan regresi $y = -0,0863x + 79,436$, setiap penambahan satu menit waktu penyimpanan menurunkan motilitas individu sebesar 0,0863%. Penurunan ini sejalan dengan temuan Ratnawati *et al.* (2019), yang menyatakan bahwa peningkatan durasi penyimpanan menyebabkan metabolisme spermatozoa tetap berlangsung sehingga menghasilkan radikal bebas yang merusak struktur sel dan mengurangi cadangan energi. Kusumawati *et al.* (2019) juga menegaskan bahwa penyimpanan yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada membran plasma dan mitokondria, sehingga menurunkan kapasitas gerak spermatozoa.

Selain faktor oksidatif, penurunan motilitas juga dapat disebabkan oleh menurunnya integritas akrosom, perubahan fluiditas membran, serta penurunan kemampuan ATPase pada mitokondria yang berperan dalam produksi energi gerak. Penelitian lain menunjukkan bahwa semakin lama semen disimpan, semakin tinggi tingkat fragmentasi DNA spermatozoa, yang berimplikasi pada penurunan fertilitas meskipun motilitas awal tampak normal (Hidayat *et al.*, 2020). Dengan demikian, penyimpanan semen dalam jangka panjang berisiko menurunkan kualitas tidak hanya dari sisi motilitas, tetapi juga viabilitas, integritas membran, dan potensi fertilisasi.

Temuan ini menegaskan bahwa semen sapi Bali sebaiknya digunakan dalam rentang waktu tertentu untuk mempertahankan motilitas optimal, terutama dalam program inseminasi buatan. Optimalisasi penanganan pasca-pengambilan, termasuk pemilihan pengencer yang sesuai dan penggunaan agen antioksidan, dapat menjadi strategi penting untuk memperlambat penurunan kualitas spermatozoa selama penyimpanan. Dengan pendekatan tersebut, keberhasilan inseminasi buatan di lapangan dapat ditingkatkan melalui semen dengan motilitas yang lebih stabil.

Hubungan Antara Lama Penyimpanan dengan Viabilitas Spermatozoa pada Suhu 37° C - 38°C

Berdasarkan hasil penelitian, terdapat hubungan negatif antara lama penyimpanan dengan viabilitas spermatozoa, yang berarti semakin lama waktu penyimpanan maka semakin rendah persentase spermatozoa yang masih hidup. Nilai koefisien korelasi pada Tabel 1 sebesar 0,507 dengan kategori sedang,

sehingga dapat disimpulkan bahwa meskipun hubungan yang terbentuk tidak terlalu kuat, arah korelasi tetap konsisten menunjukkan penurunan kualitas seiring waktu. Viabilitas spermatozoa sendiri merupakan salah satu parameter utama dalam evaluasi kualitas semen karena secara langsung menggambarkan proporsi spermatozoa yang tetap hidup dan fungsional dibandingkan yang sudah mati. Parameter ini sangat penting dalam praktik lapangan karena menjadi tolok ukur keberhasilan program reproduksi, baik melalui perkawinan alami maupun inseminasi buatan (Sari & Prabowo, 2018).

Menurut Lestari, Susilowati, & Warsito (2014), semen yang disimpan pada suhu fisiologis 38°C selama 15–30 menit menunjukkan rata-rata viabilitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan semen yang disimpan pada suhu lebih rendah. Hal ini menegaskan bahwa suhu penyimpanan berperan penting dalam menjaga stabilitas metabolik dan integritas sel spermatozoa. Suhu yang mendekati kondisi fisiologis tubuh mampu menjaga stabilitas membran plasma, mempertahankan aktivitas enzimatis penting, serta mengurangi stres oksidatif yang berpotensi merusak sel. Hasil penelitian Suwiti, Besung, & Mahardika (2017) mendukung temuan tersebut dengan menunjukkan bahwa inkubasi semen pada suhu fisiologis dalam durasi terbatas dapat menghasilkan viabilitas spermatozoa di atas 70%, dengan tingkat kerusakan sel yang relatif minimal.

Kontribusi faktor lama waktu penyimpanan terhadap viabilitas dapat dilihat dari nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,26 atau 26%. Artinya, variabel lama penyimpanan pada suhu 37–38°C menjelaskan sekitar seperempat variasi perubahan viabilitas spermatozoa, sementara sisanya sebesar 74% dipengaruhi oleh faktor lain yang tidak dianalisis secara langsung dalam penelitian ini. Berdasarkan persamaan regresi $y = -0,1592x + 88,053$, setiap penambahan satu menit waktu penyimpanan menyebabkan penurunan viabilitas sebesar 0,1592%. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun penurunan berlangsung secara bertahap, dampaknya semakin nyata apabila durasi penyimpanan semakin panjang.

Selain lama waktu penyimpanan, viabilitas spermatozoa juga sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor lain. Kondisi lingkungan seperti fluktuasi suhu dan kelembaban selama

proses penyimpanan dapat mempercepat kerusakan membran plasma (Masyitoh *et al.*, 2018). Kualitas awal semen juga berperan penting, di mana semen dengan viabilitas rendah sejak awal akan lebih cepat mengalami degradasi dibandingkan semen berkualitas baik. Faktor teknis seperti metode pengambilan semen, penanganan pasca-collecting, serta jenis dan kualitas pengencer yang digunakan turut memengaruhi daya hidup spermatozoa. Prastika *et al.* (2018) melaporkan bahwa stres oksidatif akibat paparan radikal bebas selama penyimpanan dapat merusak struktur membran dan integritas sel, bahkan dalam periode penyimpanan yang relatif singkat.

Dari perspektif biologis, penurunan viabilitas erat kaitannya dengan kerusakan membran plasma dan disfungsi mitokondria. Mitokondria merupakan organel utama penghasil energi yang menopang kelangsungan hidup spermatozoa, sehingga kerusakan pada bagian ini akan mengurangi ketersediaan energi untuk mempertahankan fungsi sel. Selain itu, peningkatan akumulasi radikal bebas dapat mempercepat terjadinya lipid peroksidasi pada membran, mengganggu fluiditas membran, serta meningkatkan risiko apoptosis spermatozoa. Penelitian lain juga menyebutkan bahwa fragmentasi DNA dapat terjadi seiring bertambahnya waktu penyimpanan, yang berdampak pada penurunan kemampuan fertilisasi meskipun spermatozoa masih terlihat hidup (Hidayat *et al.*, 2020).

Implikasi praktis dari hasil ini adalah pentingnya mengatur durasi penyimpanan semen segar agar tetap dalam batas waktu optimal untuk mempertahankan viabilitas yang tinggi. Selain itu, penggunaan pengencer yang diperkaya dengan bahan antioksidan atau zat protektif lain dapat menjadi strategi efektif untuk memperlambat penurunan viabilitas selama penyimpanan. Dengan langkah tersebut, semen yang digunakan untuk inseminasi buatan dapat tetap memiliki kualitas tinggi, sehingga peluang keberhasilan fertilisasi meningkat.

Hubungan Antara Lama Waktu Penyimpanan dengan Abnormalitas pada Suhu 37°C - 38°C

Berdasarkan Tabel 1, diketahui bahwa terdapat hubungan positif (+) antara lama penyimpanan dengan abnormalitas spermatozoa, yang berarti semakin lama waktu penyimpanan maka semakin tinggi persentase spermatozoa yang mengalami kelainan

morfologi. Nilai koefisien korelasi sebesar 0,197 termasuk kategori sangat lemah, sehingga meskipun arah hubungannya jelas, kontribusi lama penyimpanan terhadap peningkatan abnormalitas masih relatif kecil. Hal ini ditunjukkan pula oleh nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,04 atau 4%, yang berarti lama penyimpanan hanya menjelaskan sebagian kecil variasi abnormalitas spermatozoa, sementara 96% sisanya dipengaruhi oleh faktor lain. Dengan demikian, walaupun penyimpanan berpengaruh, faktor intrinsik maupun ekstrinsik lain lebih dominan dalam menentukan tingkat abnormalitas.

Pada suhu fisiologis sekitar 37–38°C, pemeriksaan morfologi spermatozoa dapat dilakukan dengan representasi yang lebih mendekati kondisi *in vivo*. Suhu ini membantu mempertahankan integritas struktural sel dan mencegah kerusakan mekanis akibat fluktuasi lingkungan yang ekstrem. Menurut Irvanto dkk. (2018), abnormalitas spermatozoa dikelompokkan menjadi dua kategori, yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer biasanya terbentuk selama proses spermatogenesis di testis, mencakup kelainan bentuk kepala, leher, atau ekor akibat gangguan genetik, nutrisi, atau kesehatan reproduksi. Sebaliknya, abnormalitas sekunder muncul akibat perlakuan pasca-spermatogenesis, seperti kesalahan saat penyimpanan, manipulasi, atau penggunaan media pengencer yang tidak optimal.

Persamaan regresi antara lama penyimpanan dengan abnormalitas diperoleh $Y = 0,0172x + 2,5173$. Persamaan ini menunjukkan bahwa setiap penambahan satu menit waktu penyimpanan berpotensi meningkatkan abnormalitas sebesar 0,0172%. Walaupun peningkatan ini relatif kecil per menit, efek kumulatifnya dapat menjadi signifikan ketika durasi penyimpanan cukup panjang. Ducha dkk. (2015) menyatakan bahwa kualitas semen sangat dipengaruhi oleh lamanya penyimpanan karena metabolisme sel spermatozoa terus berlangsung meskipun berada dalam media inkubasi. Proses metabolisme ini menghasilkan produk sampingan berupa radikal

bebas reaktif (ROS) yang dapat merusak membran plasma, mitokondria, maupun inti sel spermatozoa.

Menurut Aliyah dkk. (2022), semakin lama semen disimpan maka semakin tinggi risiko terjadinya kerusakan membran plasma serta peningkatan produksi ROS yang pada akhirnya memperbesar peluang timbulnya abnormalitas morfologi. Hal ini diperkuat oleh temuan Manjunath (2012) dalam Aliyah dkk. (2022) yang menegaskan bahwa abnormalitas primer dapat dipicu oleh kegagalan spermatogenesis, faktor genetik, penyakit, maupun kondisi lingkungan yang buruk, sedangkan abnormalitas sekunder lebih erat kaitannya dengan penanganan semen pasca-pengambilan. Susilawati (2013) juga menekankan bahwa lamanya penyimpanan semen berhubungan erat dengan penurunan motilitas dan viabilitas, serta peningkatan abnormalitas spermatozoa. Dengan kata lain, kualitas semen segar tidak hanya ditentukan oleh nilai motilitas dan viabilitas, tetapi juga oleh stabilitas morfologinya selama penyimpanan.

Implikasi praktis dari temuan ini adalah bahwa abnormalitas spermatozoa perlu mendapat perhatian yang sama pentingnya dengan parameter lain. Meskipun kontribusi lama penyimpanan terhadap abnormalitas terukur relatif kecil, keberadaan abnormalitas yang tinggi dapat berdampak langsung pada menurunnya kemampuan fertilisasi. Oleh karena itu, strategi penyimpanan semen segar perlu dioptimalkan, misalnya melalui pengendalian waktu inkubasi, pemilihan media pengencer yang tepat, serta penambahan antioksidan untuk mengurangi dampak negatif ROS. Dengan demikian, kualitas semen yang digunakan dalam inseminasi buatan dapat dipertahankan secara maksimal, sehingga meningkatkan peluang keberhasilan reproduksi.

KESIMPULAN

Lama waktu penyimpanan memiliki hubungan signifikan dengan viabilitas spermatozoa, sedangkan motilitas individu dan abnormalitas tidak menunjukkan hubungan signifikan. Lama penyimpanan menurunkan

motilitas individu serta viabilitas, namun meningkatkan abnormalitas spermatozoa seiring bertambahnya waktu. Hubungan negatif terjadi pada motilitas individu dan viabilitas, sedangkan hubungan positif ditemukan pada abnormalitas. Korelasi paling tinggi terdapat pada viabilitas dengan nilai 0,507 dan koefisien determinasi sebesar 26%, yang menunjukkan bahwa lama penyimpanan memberikan pengaruh nyata terhadap kualitas semen segar terutama pada aspek viabilitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrefani, F., Putranti, O., D., Hoda, A., 2019. Pengaruh lama thawing terhadap kualitas spermatozoa semen beku sapi Bali (*Bos sondaicus*) di Dinas Pertanian Provinsi Maluku Utara. *J. Anim. Husbandry Sci.* 3: 11-17.
- Aliyah, N.S., Santoso, H., Zayadi, H. 2022. Analisis Normalitas dan Abnormalitas Spermatozoa Segar Sapi Limousin (*Bos taurus*) dan Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Sebelum Proses Pembekuan di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Malang. *Sciscitatio.* 3(1):47-55.
- Badan Standardisasi Nasional. 2021. Semen Beku – Bagian 1: Sapi. Badan Standardisasi Nasional. SNI 4869-1:2021. BSN Jakarta.
- Budhi, S. P. S., Sudewa, M., & Suarna, M. 2016. Kinerja reproduksi sapi Bali di peternakan rakyat di Kecamatan Gerokgak Kabupaten Buleleng. *Buletin Veteriner Udayana*, 8(1), 40–45.
- Ducha, N., Susilawati, T., Aulanni'am, A., & Wahyuningsih, S. 2013. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin selama penyimpanan pada refrigerator dalam pengencer CEP-2 dengan suplementasi kuning telur. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1), 1–6.
- Kusumawati E D, Krisnaningsih ATN, Romadlon R R. 2016. Kualitas spermatozoa semen beku sapi simental dengan suhu dan lama thawing yang berbeda. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 26(3): 38-41.
- Mahendra, H., C., Samsudewa D., Ondho Y., S. 2018. Evaluation of semen quality of buffalo frozen semen produced by Artificial Insemination Center. *JITAA.* 43: 26-34.
- Masyitoh, H., Suprayogi, T. W., Praja, R. N., Sianto, P., Madyawati, S. P., & Saputro, A. L. 2018. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing sapera dalam pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur before freezing. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(3), 105-112.
- Muhammad, D., Isnaini, N., Yekti, A., P., A., Kuswati, Lukman, H., Y., Lutfi, M., Susilawati, T., 2018. Kualitas spermatozoa sapi Peranakan Ongole dalam pengencer air kelapa selama penyimpanan pada suhu 4-5°C. *J. Sains Peternakan.* 6: 1-9.
- Muhammad, D., Susilawati T., Wahjuningsih, S., 2016. Pengaruh penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur terhadap kualitas spermatozoa sapi FH (Frisian Holstein) kualitas rendah selama penyimpanan suhu 4-5°C. *J. Ternak Tropika.* 17: 66-76.
- Nyuwita, A., Susilawati, T., Isnaini, N., 2015. Kualitas semen segar dan produksi semen beku sapi Simmental pada umur yang berbeda. *J. Tropical Anim. Production.* 16: 61-68.
- Prastika, Z., Susilowati, S., Agustono, B., Safitri, E., & Prastiya, R. A. 2018. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Rambon di Desa Kemiren Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner.* 1(2), 38–42.
- Roflin, E., & Riana, F. 2022. Analisis Korelasi dan Regresi. Penerbit NEM.
- Sari, D. P., Prabowo, A., & Setiawan, B. 2018. Metode Penilaian Abnormalitas Spermatozoa pada Sapi. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner.* 23(2), 145-152
- Sugiyono. 2018. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif, dan R&D. Alfabeta
- Tania, M. N., Tety, S., & Muhamad, S. 2019. Kualitas semen segar sapi PO pada penyimpanan suhu kamar dan refrigerator. *Jurnal Ilmu Ternak Universitas Padjadjaran.* 19(1), 17–23. <https://doi.org/10.24198/jit.v19i1.23353>
- Varasofiari, L. N., Setiatin, E. T., & Sutopo, S. 2013. Evaluasi kualitas semen segar sapi Jawa Brebes berdasarkan lama waktu penyimpanan. *Animal Agriculture Journal.* 2(1), 1–6.