

Komparasi Kualitas Semen Segar dan Beku pada Sapi Pejantan Limousin di *Teaching Farm* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Agil Ramadhan Achmad

*Laboratorium Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga,
Surabaya, Indonesia*
agilra96@gmail.com

Diterima: 27 Desember 2024 | Disetujui: 3 Februari 2025

ABSTRAK

Salah satu cara untuk mengurangi nilai impor daging sapi secara nasional yaitu dengan program peringkatan jumlah anakan sapi potong pada skala peternak rakyat, melalui peningkatan efisiensi reproduksi sapi menggunakan teknologi inseminasi buatan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kualitas semen segar dan semen beku sapi pejantan Limousin. Metode penelitian menggunakan eksploratif laboratoris. Hasil pengamatan makroskopis menunjukkan bahwa nilai volume semen segar adalah 4,4-7,2 ml, sementara hasil pengamatan warna pada semen segar maupun semen beku semuanya berwarna putih susu. Konsistensi pada semen segar termasuk kental, sedangkan pada semen beku tergolong cair. Pengukuran pH pada semen segar dan beku menunjukkan hasil 6,7. Sementara itu, hasil pengukuran motilitas semen segar diperoleh nilai 77% dan pada semen beku menunjukkan hasil 41,5%. Abnormalitas semen segar menunjukkan nilai 1,30%, sedangkan pada semen beku diperoleh hasil 0,00%. Hasil pemeriksaan konsentrasi spermatozoa pada semen segar sebanyak $1.426(10^6)/ml$, sedangkan pada semen beku sebesar $26,6(10^6)/ml$. Hasil evaluasi mikroskopis menunjukkan bahwa terdapat lima variabel yang berbeda nyata ($p<0,05$) yaitu volume, kekentalan, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi, serta terdapat dua variabel yang menunjukkan tidak beda nyata ($p>0,05$) yaitu warna dan pH. Disimpulkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada lima variabel yang diukur tetapi perbedaan tersebut masih dalam batas ambang yang wajar sesuai standar baku mutu kualitas yang diterbitkan oleh Badan Standarisasi Nasional Tahun 2021.

Kata Kunci: eksploratif laboratoris, inseminasi buatan, makroskopis, mikroskopis

Comparison of Fresh and Frozen Semen Quality in Limousin Bull at the Teaching Farm, Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University

ABSTRACT

One way to reduce the value of beef imports nationally is to conduct a program to increase the number of beef cattle breeders at the smallholder scale by increasing the efficiency of cattle reproduction through artificial insemination technology. The purpose of the study was to determine the difference in the quality of fresh semen and frozen semen of Limousin bulls. The research method used exploratory laboratory. The results of

macroscopic observations showed that the value of fresh semen volume was 4.4-7.2 ml., the results of color observations on fresh and frozen semen were all milky white. The consistency of fresh semen is thick while frozen semen is liquid. Measurement of pH in fresh and frozen semen showed a result of 6.7, while the results of fresh semen motility measurements obtained a value of 77% and in frozen semen showed a result of 41.5%. Abnormality of fresh semen showed a value of 1.30% while in frozen semen the result was 0.00%. The results of the examination of spermatozoa concentration in fresh semen were 1,426(106)/ml, while in frozen semen it was 26.6(106)/ml. The results of microscopic evaluation showed that there were five variables that were significantly different ($p<0.05$), namely volume, viscosity, motility, abnormality, and concentration, and there were two variables that showed no significant difference ($p>0.05$), namely color and pH. It was concluded that there are significant differences in the five variables measured but these differences are still within reasonable threshold limits according to the quality standards published by the National Standardization Agency in 2021.

Keywords: exploratory laboratory, artificial insemination, macroscopic, microscopic

PENDAHULUAN

Pada umumnya, tingkat kemampuan reproduksi (fertilitas) pada sapi potong baik pejantan maupun sapi betina merupakan salah satu faktor yang berdampak cukup signifikan terhadap performa keturunan yang dihasilkannya. Adanya kemampuan sperma (semen) dapat membuahi sel telur (ovum) pada sapi potong betina merupakan penanda pada fertilitas sapi pejantan, sedangkan pada fertilitas sapi betina lebih ditunjukkan oleh tanda-tanda birahi (estrus) dan terjadi ovulasi. Berbagai faktor dapat mempengaruhi performa fertilitas sapi potong di antaranya faktor genetik (Schmutz *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2014; Brown & Vosloo, 2017; Kasimanickam *et al.*, 2018), nutrisi pakan yang cukup dan seimbang (Novo *et al.*, 2020; Susilowati, 2020; Winton *et al.*, 2024), manajemen peternakan yang baik dan efektif termasuk program kesehatan secara terstruktur (Broom, 1991; Etim & Oguike, 2014; Jones, 2018; Novo *et al.*, 2020; Winton *et al.*, 2024), dan lingkungan yang mencerminkan kondisi alami (Lynch, 2010; Miller, 2017; Winton *et al.*, 2024). Pentingnya manajemen reproduksi yang baik merupakan salah satu faktor penentu yang berpengaruh pada performa produksi sapi potong. Menurut Winton *et al.* (2024), perawatan reproduksi yang efektif dan efisien serta penentuan waktu yang tepat dalam inseminasi adalah hal penting dalam manajemen reproduksi.

Teknologi Inseminasi Buatan (IB) merupakan salah satu cara yang cukup efektif dan efisien dalam meningkatkan produksi daging melalui peningkatan jumlah anakan/pedet dan kualitas genetik ternak (Sabdoningrum *et al.*, 2018). Cara yang digunakan adalah dengan memanfaatkan peluang sapi pejantan terbaik agar dapat mengawini lebih dari satu indukan dan dapat meningkatkan kualitas genetik dari sapi (Susilawati, 2013). IB merupakan proses pemasukan semen sapi pejantan yang telah terseleksi ke dalam vagina sapi betina yang sedang birahi dengan menggunakan peralatan yang dibuat oleh manusia (Bandini, 2004). Beberapa persyaratan yang perlu mendapatkan perhatian dalam melaksanakan IB, yaitu a) mutu semen beku dari Balai Inseminasi Buatan, b) fisiologi sapi betina, dan c) kualifikasi keahlian inseminator dan peternak dalam ketepatan waktu IB dan deposisi semen (Susilawati, 2011).

Daging sapi merupakan salah satu hasil hewan ternak yang menjadi sumber protein hewani dan sangat mendukung kebutuhan pokok pangan di Indonesia. Menurut Badan Pusat Statistik, kebutuhan daging sapi segar untuk konsumsi rumah tangga nasional pada tahun 2023 adalah 139,47 ribu ton per tahun, atau turun 7,54% dari tahun sebelumnya. Sementara itu, rata-rata konsumsi daging sapi per kapita per tahun pada tahun 2023 adalah 0,5 kilogram, yang juga turun 9,1% dari tahun 2022. Indonesia masih melakukan impor daging sapi untuk memenuhi kebutuhan masyarakat karena peningkatan produksi daging sapi belum mencukupi (BPS, 2023). Salah satu upaya untuk memangkas dan mengurangi nilai impor daging sapi maka perlu dilakukan program peningkatan jumlah anakan sapi potong pada skala peternak rakyat dengan cara meningkatkan efisiensi reproduksi sapi melalui teknologi inseminasi buatan. Sapi Limousin merupakan salah satu contoh sapi potong berkarakteristik unggul yang layak dimanfaatkan sebagai pejantan bagi para peternak lokal. Sapi Limousin merupakan komoditi yang menguntungkan untuk dikembangkan di Indonesia. Selain iklimnya yang cocok, sapi

Limousin mampu menghasilkan daging lebih banyak dibanding sapi jenis lokal, dengan berat dapat mencapai sekitar 1 ton pada sapi dewasa (Yulianto, 2010).

Berikut beberapa ciri sapi Limousin, antara lain tingkat pertumbuhan yang tinggi dan tubuh yang panjang. Sapi Limousin dapat tumbuh setinggi 1,5 m dan panjang badan 1,75 hingga 1,95 meter. Kisaran bobot badan lahir tergolong kecil sampai sedang. Sapi jantan dewasa berbobot 1.100 kg, sedangkan sapi betina dewasa beratnya bisa mencapai 575 kg. Sapi Limousin memiliki tingkat kelahiran yang tinggi (98%), kemudahan melahirkan (99%), kemampuan menyusui dan merawat anak, serta pertumbuhan yang cepat (Blakely & Bade, 1994).

Kualitas semen merupakan faktor yang perlu diperhatikan dalam mengembangkan inseminasi buatan karena berpengaruh pada keberhasilan pelaksanaan inseminasi buatan. Sperma berkualitas tinggi telah terbukti secara progresif akan menghasilkan keturunan yang lebih baik (Medeiros et al., 2002). Beberapa faktor yang mempengaruhi produksi semen pada sapi pejantan antara lain: umur, genetik, suhu, musim, pakan, berat badan, dan frekuensi ejakulasi (Ismaya, 2014). Ditegaskan pula oleh Lestari et al. (2013) bahwa umur berpengaruh secara signifikan terhadap volume semen segar.

Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan (FKH) didirikan pada tahun 1989. Pada tahun 2021 Taman Ternak Pendidikan tersebut berubah menjadi Teaching Farm Unit produksi semen beku. Unit produksi semen beku Teaching Farm mempunyai tugas pokok untuk memproduksi dan mendistribusi semen beku sapi dalam memenuhi kebutuhan inseminasi buatan, khususnya di daerah Jawa Timur dan wilayah lainnya di Indonesia. Pada Teaching Farm FKH Universitas Airlangga Surabaya, proses pengelolaan kualitas spermatozoa segar dilakukan dengan mengukur kualitas spermatozoa secara makroskopis yang meliputi volume, warna, kekentalan, dan pH, serta pengukuran mikroskopis yang terdiri atas motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi.

Berdasarkan atas pentingnya data tentang manajemen reproduksi yang baik terutama berkaitan dengan perawatan reproduksi yang efektif dan efisien dalam penentuan waktu yang tepat untuk inseminasi sapi potong Limousin, serta dalam rangka usaha mengurangi ketergantungan nilai impor daging sapi, maka perlu dilakukan penelitian tentang perbandingan kualitas semen segar dan beku pada sapi pejantan Limousin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kualitas semen segar dan semen beku pada sapi pejantan Limousin.

METODE PENELITIAN

Waktu, Lokasi, dan Parameter Penelitian

Penelitian dilakukan selama dua bulan yaitu November sampai dengan Desember 2024 di Laboratorium Produksi Semen Beku *Teaching Farm*, Desa Tanjung, Kecamatan Kedamean, Kabupaten Gresik, Provinsi Jawa Timur. Parameter yang diamati secara makroskopis meliputi volume, warna, kekentalan, dan pH, sedangkan pengamatan mikroskopis terdiri atas motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi. Metode pemeriksaan volume, warna, dan kekentalan semen segar diamati dengan melihat tabung berskala dan mikrotube. Pengukuran pH dilakukan dengan kertas laktmus, sedangkan pemeriksaan motilitas dan abnormalitas menggunakan mikroskop. Adapun untuk pemeriksaan konsentrasi dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer.

Metode dan Sampel Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah eksploratif laboratoris yaitu dengan menilai kualitas semen segar yang terdiri dari motilitas spermatozoa dan konsentrasi semen segar dibandingkan dengan kualitas semen beku yang diambil dari 8 kali proses produksi semen beku. Pada setiap proses produksi semen beku terdapat 2 ekor sapi pejantan Limousin, pada setiap pejantan diambil sebanyak 2 kali ejakulat dalam 1 kali proses produksi semen beku. Jumlah total sampel pemeriksaan sebanyak 140 data, yang terdiri dari 20 data untuk masing-masing parameter: volume, warna, kekentalan, pH, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi.

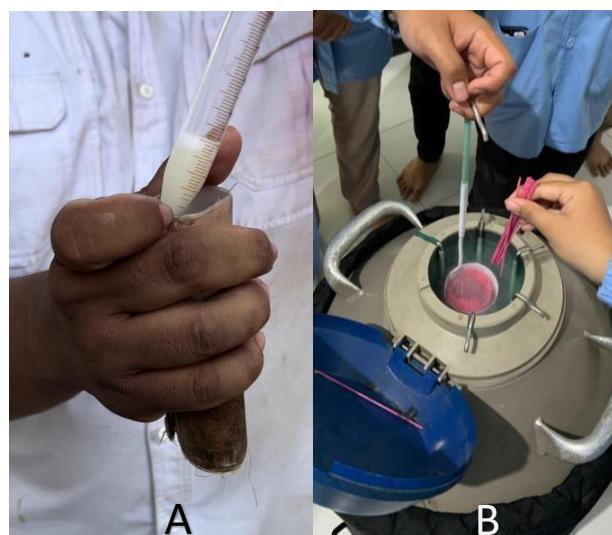
Cara Kerja

Pada dasarnya pengukuran volume pada semen segar dan beku (Gambar 1A dan 1B) memiliki prinsip kerja yang relatif sama yaitu dengan mengukur volume semen segar maupun semen beku melalui skala alat pada alat ukur yang digunakan. Pada semen segar diukur menggunakan tabung berskala pada set vagina buatan yang digunakan untuk menampung semen segar pada sapi pejantan. Hal ini sejalan dengan pendapat Susilawati (2011), volume semen segar dapat diamati dengan menggunakan tabung yang pada dindingnya terdapat skala volume, yaitu dengan cara setelah semen ditampung pada tabung tersebut, kemudian langsung dapat dilihat volume semen yang diperoleh. Pemeriksaan volume semen beku dilakukan dengan cara mendinginkannya (*thawing*) pada *water bath* pada suhu 37,5°C selama 30 detik, selanjutnya menuangkan semen yang terdapat pada straw ke dalam mikrotube dan mengukurnya dengan pipet ukur yang berukuran 0,1 ml. Berikut pemeriksaan parameter yang diteliti.

1. Pemeriksaan warna semen segar dapat diamati dengan cara melihat tabung berskala pada set vagina buatan yang digunakan untuk menampung semen segar pada sapi pejantan. Adapun pemeriksaan warna semen beku dilakukan dengan cara mendinginkannya (*thawing*) pada *water bath* dengan suhu 37,5°C selama 30 detik, selanjutnya menuangkan semen yang terdapat pada straw ke dalam mikrotube dan diamati warnanya.
2. Pemeriksaan kekentalan semen segar dapat diamati dengan melihat tabung berskala pada set vagina buatan yang digunakan untuk menampung semen segar pada sapi pejantan dengan cara mengamati proses turunnya semen segar tersebut pada saat tabung berskala dimiringkan dan dikembalikan pada posisi semula atau tegak lurus, apakah cepat, sedang, atau lambat. Sedangkan pada pemeriksaan untuk warna semen beku dilakukan dengan cara mendinginkannya pada *water bath* pada suhu 37,5°C selama 30 detik, selanjutnya menuangkan semen yang terdapat pada straw ke dalam mikrotube kemudian diamati prosesnya apakah cepat, sedang, atau lambat semen segar tersebut turun pada saat mikrotube dimiringkan dan dikembalikan pada posisi semula atau tegak lurus.
3. Pemeriksaan pH semen segar dapat diamati dengan menggunakan kertas laksus pH 6,4-8 yang dicelupkan pada sampel semen segar yang sudah ditampung dari sapi pejantan. Sedangkan pada pemeriksaan pH semen beku dengan cara mendinginkannya / *thawing* pada *water bath* dengan suhu 37,5°C selama 30 detik, selanjutnya menuangkan semen yang terdapat pada straw ke dalam mikrotube kemudian diperiksa menggunakan kertas laksus pH 6,4-8.
4. Pemeriksaan motilitas pada semen segar dilakukan dengan cara menghangatkan mikrotube, *object glass*, dan *cover glass* pada *table warmer* pada suhu 37,5°C, selanjutnya mencampur semen segar serta diluter dengan perbandingan 1:29. Dalam pelaksanaannya diambil 2,5 µl semen segar dan 72,5 µl diluter ditempatkan pada mikrotube dan dihomogenkan, kemudian diambil 3 µl larutan campuran semen segar dan diluter tersebut menggunakan mikropipet berukuran 0,5-10 µl, dan diteteskan ke *object glass* langsung ditutup dengan *cover glass* berukuran 18x18 mm. Langkah berikutnya diperiksa di bawah mikroskop Olympus CX-40 *phase contrast* dengan perbesaran 200x dan 400x dengan menilai sebanyak 5 kali lapang pandang untuk menghasilkan data hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa pada sampel semen segar. Adapun pemeriksaan motilitas pada semen beku dilakukan dengan cara menghangatkan mikrotube, *object glass*, dan *cover glass* pada *table warmer* pada suhu 37,5°C, selanjutnya mengambil semen beku dan mendinginkannya / *thawing* pada *water bath* dengan suhu 37,5°C selama 30 detik. Langkah berikutnya menuangkan semen yang terdapat pada straw ke dalam mikrotube dan dihomogenkan, selanjutnya mengambil 3 µl sampel semen menggunakan mikropipet berukuran 0,5-10 µl dan diteteskan ke *object glass*. Langkah selanjutnya ditutup dengan *cover glass* berukuran 18x18 mm dan diamati di bawah mikroskop Olympus CX-40 *phase contrast* dengan perbesaran 200x dan 400x dengan menilai sebanyak 5 kali lapang pandang untuk menghasilkan data hasil pemeriksaan motilitas spermatozoa pada sampel semen beku.
5. Pemeriksaan abnormalitas pada semen segar dengan mencampurkan semen segar dan eosin nigrosin dengan perbandingan 1:4 yaitu 2 µl semen segar dan 8 µl eosin nigrosin, selanjutnya dibuat preparat ulas dan dikeringkan, kemudian diamati di bawah mikroskop sebanyak 10 lapang

pandang dengan total jumlah spermatozoa sebanyak 200 sel dan dihitung persentasenya. Sedangkan pada semen beku dapat diamati dengan cara mendinginkannya / *thawing* pada *water bath* dengan suhu 37,5°C selama 30 detik, selanjutnya menuangkan semen yang terdapat pada straw ke dalam mikrotube kemudian dihomogenkan, selanjutnya mencampurkan semen beku dan eosin nigrosin dengan perbandingan 1:4 yaitu 2 µl semen segar dan 8 µl eosin nigrosin, selanjutnya dibuat preparat ulas dan dikeringkan, kemudian diamati di bawah mikroskop sebanyak 10 lapang pandang dengan total jumlah spermatozoa sebanyak 200 sel dan dihitung persentasenya.

6. Pemeriksaan konsentrasi pada semen segar menggunakan alat *Spectrophotometer SDM 6* Minitube caranya dengan mencampur semen segar dan NaCl 0,9% pada perbandingan 1:100. Sejumlah 3,5 ml NaCl 0,9% diambil menggunakan pipet dan dituangkan ke dalam cuvet, selanjutnya semen segar diambil sebanyak 35 µl menggunakan mikropipet 10-100 µl dan dituangkan ke dalam cuvet yang berisi 3,5 ml NaCl 0,9%, kemudian dihomogenkan dan dianalisis sehingga menghasilkan data konsentrasi semen segar. Prinsip kerja dari *Spectrophotometer SDM 6* adalah intensitas cahaya yang ditransmisikan oleh larutan berbanding lurus dengan konsentrasi dari larutan tersebut. Sedangkan pemeriksaan konsentrasi semen beku dilakukan dengan cara disiapkan *counting chamber Neubauer Chamber*, mikrotube, semen beku, dan NaCl 3%. NaCl 3% diambil sebanyak 990 µl menggunakan micropipet 100-1000 µl dan dimasukkan ke dalam mikrotube. Langkah berikutnya mengambil semen beku dari kontainer dan mendinginkannya / *thawing* pada *water bath* dengan suhu 37,5°C selama 30 detik, selanjutnya semen yang terdapat pada straw dituangkan ke dalam mikrotube yang lain dan dihomogenkan. Langkah selanjutnya yaitu 10 µl sampel semen diambil menggunakan mikropipet berukuran 0,5-10 µl dan dituangkan ke dalam mikrotube yang berisi NaCl 3% dan dihomogenkan dengan cara memutar mikrotube seperti angka 8. Selanjutnya diambil 10 µl dari mikrotube yang berisi NaCl 3% dan semen kemudian dimasukkan ke dalam *chamber*. Terakhir, sampel diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x dan spermatozoa dihitung pada 5 kotak dari 25 kotak yang tersedia di *counting chamber* yaitu kotak ujung kanan atas, kanan bawah, kiri atas, kiri bawah, dan tengah, selanjutnya dihitung menggunakan rumus.
7. Pengolahan data statistik dilakukan menggunakan SPSS versi 23, dengan uji normalitas menggunakan tes Kolmogorov-Smirnov, uji homogenitas, serta dilanjutkan dengan uji Oneway ANOVA dan Mann-Whitney untuk membandingkan kualitas semen segar dan semen beku. Jumlah total sampel pemeriksaan adalah 140 data, yang terdiri atas 20 data untuk masing-masing parameter: volume, warna, kekentalan, pH, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi.



Gambar 1A. Pemeriksaan semen segar dan 1B. Pemeriksaan semen beku

HASIL DAN PEMBAHASAN

Screening Awal

Hasil pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis pada semen segar dan beku dari total sampel sebanyak 140 data dapat dilihat pada Tabel 1. Menurut Widiantoro *et al.* (2021) pemeriksaan makroskopis meliputi volume ejakulasi semen, konsistensi semen, bau semen, warna semen, dan derajat keasaman (pH) semen. Pemeriksaan makroskopis dilakukan sebagai screening awal kualitas semen sebelum diproses lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan volume, warna, kekentalan, pH, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi pada semen segar dan beku

No	Volume (ml)		Warna		Kekentalan		pH		Motilitas (%)		Abnormalitas (%)		Konsentrasi ($\times 10^6$)	
	Semen Segar	Semen Beku	Semen Segar	Semen Beku	Semen Segar	Semen Beku	Semen Segar	Semen Beku						
1	7,2	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	70	40	1	0	1.643	26
2	4,4	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	70	40	2	0	573	27
3	7	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	80	40	1	0	1.797	26
4	6	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	75	45	2	0	1.302	27
5	8,6	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	80	45	1	0	800	25
6	5	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	85	45	2	0	1949	28
7	6	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	80	40	1	0	1128	28
8	6,2	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	75	40	1	0	1747	26
9	6,6	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	75	40	1	0	1738	27
10	7,2	0,23	putih susu	putih susu	Kental	Cair	6,7	6,7	80	40	1	0	1589	26

Pengukuran Volume

Pada penelitian ini volume semen segar dari sapi Limousin yang diperoleh setelah ejakulasi sebesar 4,4-7,2 ml (Tabel 1). Perolehan besaran volume tersebut termasuk dalam kisaran normal karena menurut Feradis (2010), volume semen segar sapi pada umumnya berkisar antara 5-8 ml tergantung pada ukuran testis dan breed, sedangkan menurut Toelihere (1981), volume semen sapi memiliki kisaran 1-15 ml. Bahkan Butar-Butar (2009) menyatakan bahwa volume semen sapi jantan berkisar 1-9,1 ml dalam peningkatan kualitas semen secara exercise. Menurut Evans & Maxwell (1987), banyak dan sedikitnya volume semen yang diproduksi per ejakulasi berkontribusi dalam menentukan tingkat pengenceran inseminasi buatan.

Pada hewan muda volume semen relatif lebih sedikit dibandingkan hewan dewasa (Ax *et al.*, 2008). Pada penelitian tentang kualitas semen sapi penjantan Bali, volume semen berkorelasi positif terhadap lingkar skrotum. Lingkar skrotum lebih menggambarkan tentang ukuran testis dan menunjukkan banyaknya *tubulus seminiferus* yang memiliki fungsi untuk menghasilkan spermatozoa (Saputra *et al.*, 2017). Ukuran testis berkorelasi dengan umur, karena semakin tua umur sapi umumnya terdapat penambahan pula pada ukuran testis (Ismaya, 2014). Semakin besar ukuran testis, maka *tubulus seminiferus* akan semakin besar. Peningkatan pada *tubulus seminiferus* akan berkontribusi pada peningkatan produksi spermatozoa. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Paldusova *et al.* (2014), pada usia > 5 tahun diperoleh hasil spermatozoa yang lebih optimal dibandingkan dengan pada usia < 2 tahun.

Sebagai pelengkap informasi bahwa ukuran volume semen beku yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0,23 ml. Hal ini dapat terjadi karena dalam pengukurannya menggunakan spektrofotometer dengan pengaturan volume di *mini straw* sebesar 0,23 ml pada *mini straw* berkapasitas 0,25 ml.

Menurut BSN (2021), pengukuran volume semen beku sapi harus menggunakan *mini straw* berukuran 0,25 ml karena dengan terdapatnya sisa 0,2 ml pada *mini straw* dimaksudkan untuk mengantisipasi dari sifat air yang jika didinginkan akan bertambah volumenya. Sesuai dengan pendapat Sebayang (2024), bahwa air memiliki sifat dualisme yang anomali, adakalanya jika suhu air dipanaskan maka volumenya akan bertambah besar, begitu pula jika suhu air didinginkan maka volumenya juga akan bertambah banyak. Anomali sifat air dapat dianggap pengecualian yang dialami oleh zat cair ketika didinginkan atau dipanaskan.

Pemeriksaan Warna

Hasil pengamatan dari seluruh sampel menunjukkan bahwa baik pada semen segar maupun semen beku semuanya berwarna putih susu (Tabel 1). Warna putih susu pada kedua semen tersebut termasuk dalam kategori warna yang normal karena warna semen sapi yang berkualitas baik adalah seperti warna susu, baik krem keputih-putihan maupun putih kekuning-kuningan (Nursyam, 2007; Feradis, 2010; Susilowati *et al.*, 2023). Pernyataan ini juga diperkuat berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 10/Permentan/ PK.210/3/2016 Pasal 11 huruf h bahwa pejantan unggul yang digunakan untuk memproduksi susu beku harus mempunyai warna semen putih susu atau kekuning-kuningan (Kementerian Pertanian, 2016). Menurut Butar-Butar (2009) dan Chumairoh *et al.* (2023), warna putih kekuning-kuningan pada semen berasal dari pigmen riboflavin yang dibawa oleh satu gen autosomal resesif dan tidak berdampak terhadap fertilitas.

Berikut beberapa indikasi pada warna semen yang sekaligus menggambarkan penyebab terjadinya perubahan pada warna tersebut. Apabila semen berwarna merah maka semen terindikasi terkena darah akibat luka atau infeksi pada saluran reproduksi jantan. Jika semen berwarna kecoklatan, menunjukkan adanya darah pada semen yang telah mengalami dekomposisi. Semen dengan warna coklat muda kehijau-hijauan menandakan kemungkinan telah terjadi kontaminasi dengan feses (Toelihere, 1981; Feradis, 2010). Semen berwarna kuning atau putih kotor menunjukkan bahwa semen telah bercampur dengan urin atau nanah sebagai akibat reaksi radang lainnya. Apabila semen pada suhu ruang berwarna hijau kekuningan maka diduga kuat pada semen tersebut terdapat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Sementara itu, apabila di dalam semen terdapat gumpalan, bekuan, dan kepingan menunjukkan keberadaan nanah yang biasanya berasal dari kelenjar asesoris atau ampula (Feradis, 2010).

Pemeriksaan Kekentalan (Konsistensi)

Tabel 1 dan 2 memberikan gambaran bahwa hasil pemeriksaan terhadap kekentalan (konsistensi) pada semen segar yang diperoleh termasuk dalam kategori kental (pekat) dengan konsentrasi spermatozoa sebanyak $1.426(10^6)/\text{ml}$, sedangkan pada semen beku tergolong cair dengan konsentrasi spermatozoa sebanyak $26,6(10^6)/\text{ml}$. Konsentrasi spermatozoa yang diperoleh menurut Toelihere (1981) masih termasuk dalam kisaran 1.000-1.800 juta/ml sehingga konsistensinya tergolong kental. Menurut Evans & Maxwell (1987) konsistensi semen cenderung bergantung pada konsentrasi spermatozoa dan seminal plasma, pada semen yang tergolong dalam konsistensi kental lebih banyak mengandung spermatozoa bila dibandingkan dengan semen yang berkonsistensi encer. Menurut Feradis (2010) dan Susilawati (2011), konsistensi kepekatan/kekentalan sperma berkorelasi positif terhadap konsentrasi spermatozoa, artinya semakin kental konsistensi semen maka semakin tinggi konsentrasi spermatozoanya.

Pengukuran Derajat Keasaman (pH)

Hasil pemeriksaan pH pada semen segar maupun semen beku diperoleh nilai rata-rata sebesar 6,7 (Tabel 1). Kisaran pH tersebut termasuk dalam kategori normal karena menurut Rahmawati *et al.* (2015), nilai pH semen pada sapi Limousin dan sapi di Eropa lainnya berkisar antara 6-7. Ditegaskan pula oleh Susilowati *et al.* (2023), nilai rata-rata pH semen sapi jenis Limousin dan Simmental tergolong dalam keadaan normal apabila berada pada kisaran 6,4-6,8. Kecenderungan pH semen sapi bersifat asam ($\text{pH} < 7$) karena dipengaruhi oleh aktivitas metabolisme spermatozoa termasuk variasi jumlahnya. Semakin banyak jumlah spermatozoa, maka menjadikan produksi asam laktat meningkat sehingga pH

semen semakin rendah (Chumairoh *et al.*, 2023). Di samping itu, semakin tinggi frekuensi penampungan ejakulasi semen, maka pH cenderung semakin asam (Muada *et al.*, 2017). Sifat semen yang terlalu asam atau basa akan mengakibatkan sel-sel spermatozoa cepat mati. Nilai pH semen yang tinggi dipengaruhi oleh banyaknya konsentrasi spermatozoa sehingga cenderung asam dalam batas normal (Sunami *et al.*, 2017).

Pemeriksaan Motilitas

Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan motilitas diperoleh nilai rata-rata untuk semen segar sebesar 77% dan semen beku sebesar 41,5%. Motilitas semen segar tersebut tergolong normal, sedangkan pada semen beku termasuk tidak normal. Toelihere (1981) berpendapat bahwa, motilitas individu semen segar pada sapi pejantan berkisar 50-80% spermatozoa progresif sehingga mampu menghasilkan gerakan massa, sedangkan menurut Susilawati (2011) motilitas semen segar sapi memiliki kisaran nilai 70-90%. Adapun Hafez (2000) mengatakan bahwa persentase hidup semen segar pada sapi memiliki nilai sebesar 60-80%.

Motilitas pada semen merupakan parameter penting untuk mengevaluasi potensi fertilitas sapi pejantan, karena menurut Hertoni (2007) bahwa motilitas spermatozoa berkorelasi positif dalam penentuan persentase spermatozoa hidup. Amann & Waberski (2014) berpendapat, spermatozoa harus diberikan perlakuan khusus untuk mencapai potensi maksimal dalam fertilisasi. Motilitas juga berkaitan erat dengan kerusakan DNA, motilitas adalah hal yang krusial pada fertilisasi (Puglisi *et al.*, 2017). *Immobil* spermatozoa atau spermatozoa yang tidak bergerak dan kelainan pada motilitas dapat dijadikan indikator *infertil* pada sapi pejantan (Longobardi *et al.*, 2017). Standar pengujian untuk mengukur fertilitas sapi pejantan adalah dengan cara menghitung persentase spermatozoa yang memiliki gerakan maju (Berg *et al.*, 2018).

Spermatozoa memiliki ekor yang digunakan untuk memobilisasi pergerakan di dalam saluran reproduksi betina dan membuahi oosit (Vyklicka & Lishko, 2020). Spermatozoa bergerak dengan cepat dan kuat sesaat setelah dikeluarkan, kapasitasi diperlukan untuk mengaktifkan reaksi akrosom serta fertilisasi (Moghbeli *et al.*, 2016). Secara garis besar, ATP berperan penting dalam gerakan ekor spermatozoa. Ketika spermatozoa bergerak cepat dan kuat mengakibatkan konsumsi energi intraseluler semakin cepat, di sisi lain ATP merupakan salah satu indikator potensial dalam terjadinya fertilisasi (Blanco *et al.*, 2011).

Pemeriksaan Abnormalitas

Abnormalitas adalah penyimpangan bentuk morfologi spermatozoa dari bentuk normalnya. Abnormalitas menjadi salah satu indikator dalam menentukan kualitas spermatozoa karena spermatozoa yang abnormal dapat menghambat proses fertilisasi (Afiati *et al.*, 2015). Nilai rata-rata dari hasil pemeriksaan abnormalitas pada semen segar adalah 1,3%, sedangkan pada semen beku 0,0% (Tabel 1 dan 2). Perolehan nilai abnormalitas pada kedua semen tersebut tergolong baik dan layak untuk digunakan dalam program inseminasi buatan (IB). Menurut Rizal (2002), kualitas semen sapi pejantan yang baik dan layak digunakan dalam program IB adalah yang memiliki spermatozoa abnormal < 15%. Bahkan Aliyah *et al.* (2022) menyatakan bahwa, nilai rata-rata abnormalitas semen pada sapi pejantan Limousin adalah kurang dari 20%. Kondisi ini juga menggambarkan bahwa status kesehatan reproduksi pada sapi pejantan Limousin dapat dikatakan normal, tidak menunjukkan adanya tanda-tanda infertilitas. Ditegaskan oleh Toelihere (1979), kondisi sperma dengan nilai abnormalitas sebesar 30-35% menunjukkan adanya ketidaksuburan (infertilitas) pada sistem reproduksi sapi pejantan.

Pemeriksaan Konsentrasi

Penilaian konsentrasi spermatozoa per mililiter semen sangat penting, karena faktor ini dipakai sebagai kriteria penentu kualitas semen dan menentukan tingkat pengencerannya pada saat digunakan dalam program IB. Tabel 1 dan 2 menggambarkan bahwa hasil pemeriksaan konsentrasi spermatozoa dalam semen segar diperoleh nilai sebesar $1.426(10^6)/\text{ml}$, sedangkan dalam semen beku sebanyak $26,6(10^6)/\text{ml}$. Konsentrasi semen sapi bervariasi dari 1000-1800 juta spermatozoa per mililiter atau 800-

2000 juta spermatozoa per mililiter (Garner & Hafez, 2008), sedangkan menurut Bearden & Fuquay (1984) mengatakan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi antara sapi perah dan sapi potong, yaitu 1200 juta spermatozoa per mililiter untuk sapi perah dan 1000 juta spermatozoa per mililiter pada sapi potong. Menurut Aerens *et al.* (2012), berdasarkan analisis ragam menunjukkan bahwa adanya nilai konsentrasi spermatozoa pada kelompok sapi berbeda, hal ini berarti terdapat perbedaan yang sangat nyata. Diduga kuat adanya perbedaan konsentrasi spermatozoa di antara sapi pejantan karena adanya perbedaan kualitas genetik pada masing-masing pejantan (Situmorang, 2002). Menurut Salisbury & van Demark (1985), beberapa parameter yang turut berpengaruh terhadap konsentrasi spermatozoa antara lain kesehatan alat reproduksi, perkembangan seksual dan kedewasaan, frekuensi ejakulasi pejantan, besar testis, umur, dan kualitas pakan yang diberikan.

Uji Statistik

Hasil pengolahan data pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis pada semen segar dan beku dapat dilihat pada Tabel 2. Sebanyak 140 data dilakukan uji Kolmogorov Smirnov untuk melihat normalitas dari keseluruhan data, kemudian dilakukan pengujian homogenitas menggunakan ANNOVA, serta pemeriksaan warna dan kekentalan dilakukan dengan menggunakan Mann-Whitney.

Tabel 2. Rata-rata, Standart Deviasi (SD), ANOVA dan Mann-Whitney pada sampel data volume, warna, kekentalan, pH, motilitas, abnormalitas, konsentrasi pada semen segar dan beku

	Volume (ml)		Warna		Kekentalan		pH		Motilitas (%)		Abnormalitas (%)		Konsentrasi ($\times 10^6$)	
	Semen		Semen		Semen		Semen		Semen		Semen		Semen	
	Segar	Beku	Segar	Beku	Segar	Beku	Segar	Beku	Segar	Beku	Segar	Beku	Segar	Beku
Rata-rata	6,20	0,23	putih susu	putih susu	kental	cair	6,70	6,70	77	41,5	1,30	0,00	1.426	26,6
SD	1,13	0,00	putih susu	putih susu	kental	cair	0,00	0,00	4,83	2,41	0,43	0,00	460,5	0,96
Sig. Anova	0,00		-		-		1,00		0,00		0,00		0,00	
Sig. Mann- Whitney	-		1,00		0,00		-		-		-		-	

Berdasarkan tujuh variabel yang diukur yaitu volume, warna, kekentalan, pH, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi untuk membandingkan kualitas semen segar dan beku, maka hasil volume semen segar yang diperoleh sebesar $6,20 \text{ ml} \pm 1,13 \text{ ml}$, sedangkan semen beku menunjukkan hasil $0,23 \text{ ml} \pm 0,00 \text{ ml}$. Pada evaluasi pH semen segar dan beku diperoleh hasil $6,70 \pm 0,00$. Nilai motilitas semen segar yang didapatkan adalah $77\% \pm 4,83\%$, sedangkan pada semen beku sebesar $41,5\% \pm 2,41\%$. Abnormalitas semen segar menunjukkan nilai $1,30\% \pm 0,43\%$, sedangkan pada semen beku nilai yang dihasilkan sebesar $0,00\% \pm 0,00\%$. Perolehan nilai konsentrasi semen segar adalah $1.426 \times 10^6 \pm 460,5 \times 10^6 / \text{ml}$, sedangkan pada semen beku sebesar $26,6 \times 10^6 \pm 0,96 / \text{ml}$. Berdasarkan analisis ragam dari keseluruhan hasil yang diperoleh ini menggambarkan adanya lima variabel yang berbeda nyata ($p<0,05$) yaitu volume, kekentalan, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi, serta terdapat dua variabel yang tidak berbeda nyata ($p>0,05$) yaitu warna dan pH. Berdasarkan hasil perhitungan, jika melihat nilai-nilai parameter yang menunjukkan perbedaan nyata, berarti terdapat perbedaan signifikan antara kualitas semen segar dan semen beku. Namun, menurut peraturan Badan Standardisasi Nasional (2021), semen beku dinyatakan memenuhi standar jika memiliki motilitas minimal 40%, konsentrasi minimal $25 \times 10^6 / \text{ml}$, dan abnormalitas $\leq 20\%$. Hal ini menunjukkan bahwa semen

beku yang dihasilkan dalam penelitian ini masih memenuhi standar kualitas dan layak digunakan dalam program-program IB.

KESIMPULAN

Mengacu dari hasil evaluasi makroskopis (volume, warna, konsistensi, pH, motilitas, abnormalitas, dan konsentrasi semen) dan mikroskopis (uji statistik), maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan nyata pada lima variabel yang diukur tetapi perbedaan tersebut masih dalam batas ambang yang wajar sesuai dengan standar baku mutu kualitas yang diterbitkan oleh Badan Standarisasi Nasional Tahun 2021.

Diharapkan perlu dilakukan penelitian lanjutan berkaitan dengan perbandingan kualitas semen segar dan beku sapi pejantan Limousin khususnya pada konsentrasi aspek integritas DNA-nya, sehingga dapat dipastikan mampu menjamin kualitas semen sapi pejantan, terutama spermatozoa yang diproduksi oleh *Teaching Farm*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan selesainya penelitian ini, saya mengucapkan banyak terima kasih kepada Dikky Eka Mandala Putranto, drh., M.Si. Kepala *Teaching Farm* Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga yang telah berkenan memberikan izin dalam menggunakan beberapa fasilitas di Laboratorium Reproduksi Veteriner selama riset berlangsung. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada teman-teman karyawan yang bekerja di Laboratorium Reproduksi Veteriner yang telah memberi dukungan dan membantu dalam pelaksanaan riset hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- Aerens, C.D.C, Ihsan, M.N., & Isnaini, N. (2012). *Perbedaan kuantitatif dan kualitatif semen segar pada berbagai bangsa sapi potong*. Malang: Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Afiati, F., Yulnawati, M.R., & Arifiantini, R.I. (2015). Abnormalitas spermatozoa domba dengan frekuensi penampungan berbeda. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*, 1(4), 930-934.
- Aliyah, S.N., 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), 38-46.
- Amann, R.P. & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5-17.
- Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B., & Bellin, M.E. (2008). *Semen evaluation in farm animal reproduction*. Ed. by Hafez ESE. 7th Lea Febiger, 365-375.
- Badan Pusat Statistik (BPS) (2023). *Laporan pembangunan sektor peternakan Indonesia 2023*. Jakarta: Badan Pusat Statistik.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN) (2021). *SNI 4869-1-2017. Semen beku - Bagian 1: Sapi*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Bandini, Y. (2004). *Sapi Bali*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Bearden, J.H., & Fuquay, J.W. (1984). *Applied animal reproduction*. 2nd edition reston publishing company inc. A prentice Halls Company Virginia, 341- 345.
- Berg, H.F., Kommisrud, E., Bai, G., Gaustad, E.R., Klinkenberg, G., Standerholen, F.B., Thorkildsen, L.T., Waterhouse, K.E., Ropstad, E., Heringstad, B., & Alm-Kristiansen, A.H. (2018). Comparison of sperm adenosine triphosphate content, motility and fertility of immobilized and conventionally cryopreserved Norwegian Red bull semen. *Theriogenology*, 121, 181-187.
- Blakely, J. & Bade, D.H. (1994). *Ilmu peternakan*. Cetakan ke-4. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Blanco, J.M., Long, J.A., Gee, G., Wildt, D.E., & Donoghue, A.M. (2011). Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on Turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 123(3-4), 242-248.

- Broom, D.M. (1991). Animal welfare: Concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, 69, 4167-4175.
- Brown, E.J., & Vosloo, A. (2017). The involvement of the hypothalamopituitary-adrenocortical axis in stress physiology and its significance in the assessment of animal welfare in cattle. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1), 1-9.
- Butar-Butar, E.K. (2009). *Efektivitas frekuensi exercise terhadap peningkatan kualitas semen Sapi Simmental* (Skripsi). Medan: Departemen Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara.
- Chumairoh, Z., Mubarakati, N.J., & Jayanti, G.E. (2023). Analisis kualitas spermatozoa segar pada Sapi Limousin (*Bos taurus*) terhadap berbagai variasi jumlah false mounting. *Journal of Comprehensive Science (JCS)*, 2(5), 1031-1042.
- Etim, N.A.N., & Oguike, M.A. (2014). Environmental and management stressors: Implications for reproductive and productive performances of farm animals in the tropics. *Journal of Agriculture and Sustainability*, 5(2), 153-170.
- Evans, G.W., & Maxwell, M.C. (1987). *Salamons artificial insemination of sheep and goats*. London: Butterworths.
- Feradis (2010). *Bioteknologi reproduksi pada ternak*. Bandung: Alfabeta.
- Garner, D.L., & Hafez, E.S.E. (2008). *Spermatozoa and seminal plasma in reproduction in farm animals* 7th edition. Ed by Hafez ESE, Lea, and Febiger. Philadelphia, 96-110.
- Hafez, E.S.E. (2000). *Semen evaluation in reproduction in farm animals*. 7th edition. Maryland, USA: Lippincott Williams and Wilkins.
- Hertoni, N. (2007). *Faktor-faktor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa semen beku sapi pada berbagai inseminator di Lampung Tengah* (Skripsi). Universitas Lampung: Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian.
- Ismaya (2014). *Bioteknologi inseminasi buatan pada sapi dan kerbau*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Jones, E.D. (2018). *Beef cattle management and nutrition*. CRC Press.
- Johnston, D.J., Barwick, S.A., Fordyce, G., Holroyd, R.G., Williams, P.J., Corbet, N.J., & Grant, T. (2014). Genetics of early and lifetime annual reproductive performance in cows of two tropical beef genotypes in northern Australia. *Animal Production Science*, 54(1).
- Kasimanickam, V., Abdel Aziz, R., Williams, H., & Kasimanickam, R. (2018). Predictors of beef calf temperament at weaning and its impact on temperament at breeding and reproductive performance. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(2), 484-494.
- Kementerian Pertanian (2016). *Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 10/Permentan/PK.210/3/2016 tentang penyediaan dan peredaran semen beku ternak ruminansia*. Jakarta: Kementerian Pertanian.
- Lestari, S., Saleh, D.M., & MaidaSwar (2013). Profil kualitas semen segar sapi pejantan limousin dengan umur yang berbeda di Balai Inseminasi Buatan Lembang Jawa Barat. *Jurnal Ilmu Peternakan*, 1(3), 1165-1172.
- Longobardi, V., Salzano, A., Campanile, G., Marrone, R., Palumbo, F., Vitiello, M., & Gasparrini, B. (2017). Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 88(1), 236-243.
- Lynch, E.M. (2010). Characterisation of physiological and immune-related biomarkers of weaning stress in beef cattle (Doctoral dissertation). Department of Biology and National Institute for Cellular Biotechnology, National University of Ireland Maynooth.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., & Rodrigues, J.L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology*, 57, 327-44.
- Miller, R.F. (2017). Animal health and disease management in beef cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 33(1), 57-71.
- Moghbeli, M., Kohram, H., Zare-Shahaneh, A., Zhandi, M., Sharafi, M., Nabi, M.M., & Sharideh, H. (2016). Are the optimum levels of the catalase and vitamin E in rooster semen extender after freezing-thawing influenced by sperm concentration. *Cryobiology*, 72(3), 264-268.

- Muada, D.B., Paputungan, U., Hendrik, M.J., & Turangan, S.H. (2017). Karakteristik semen segar sapi bangsa limousin dan simmental di balai inseminasi buatan lembang. *ZOOTEC*, 37(2), 360-369.
- Novo, A.F., Pérez-Garnelo, S.S., Villagrá, A., Pérez-Villalobos, N., & Astiz, S. (2020). The effect of stress on reproduction and reproductive technologies in beef cattle—A review. *Animals*, 10(2096), 1-23.
- Nursyam (2007). Perkembangan Iptek bidang reproduksi ternak untuk meningkatkan produktivitas ternak. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 21(4), 145-152.
- Paldusova, M., Kopec, T., Chladek, G., Hasek, M., Machal, L., & Falta, D. (2014). The effect of the stable environment and age on the semen production in the Czech Fleckvieh bulls. *MandelNet*, 178-182.
- Puglisi, R., Bornaghi, V., Severgnini, A., Vanni, R., Montedoro, M., & Galli, A. (2017). Evaluation of two prototype directional freezing methods and a 2ml flattened straw for cryopreservation of boar semen. *Animal Science Papers and Reports*, 35(4), 397-406.
- Rahmawati, M.A., Susilawati, T., & Ihsan, M.N. (2015). Kualitas semen dan produksi semen beku pada bangsa sapi dan bulan penampungan yang berbeda. *Jurnal ilmu-ilmu peternakan*, 25(3), 25-36.
- Rizal, M. (2002). *Fertilitas spermatozoa ejakulat epididimis domba garut hasil kriopreservasi menggunakan modifikasi pengencer Tris dengan berbagai krioprotektan dan antioksidan* (Disertasi Doktor). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sabdoningrum, E.K., Warsito, S.H., Pramono, H., & Eliana, S. (2018). Inseminasi buatan menggunakan persilangan sperma limosin dan simental melalui sinkronisasi birahi suatu usaha intensifikasi reproduksi sapi untuk peningkatan peternakan sapi rakyat di Kecamatan Kedungadem, Kabupaten Bojonegoro. *Jurnal Layanan Masyarakat Universitas Airlangga*, 02(01), 6-11.
- Salisbury, G.W., & van Demark, N.L. (1985). Alih Bahasa oleh R. Djanuar. *Fisiologi reproduksi dan inseminasi buatan pada sapi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Saputra, D.J., Ihsan, M.N., & Isnaini, N. (2017). Korelasi antara lingkar skrotum dengan volume semen, konsentrasi dan motilitas spermatozoa pejantan Sapi Bali. *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*, 18(2), 47-53.
- Schmutz, S.M., Stookey, J.M., Winkelman-Sim, D.C., Waltz, C.S., Plante, Y., & Buchanan, F.C. (2001). A QTL study of cattle behavioral traits in embryo transfer families. *Journal of Heredity*, 92(3), 290-292.
- Sebayang, M.D. (2024). *Fisika dasar, fisika panas dan penerapannya*. Jakarta: UKI Press.
- Situmorang, P. (2002). The effects of inclusion of exogenous phospholipid in tris-diluent containing a different level of egg yolk on the viability of bull spermatozoa. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 7(3), 131-187.
- Sunami, S., Isnaini, N., & Wahjuningsih, S. (2017). Kualitas semen segar dan recovery rate (RR) sapi limousin pada musim yang berbeda. *Ternak Tropika Journal of Tropical Animal Production*, 18(1), 36– 50.
- Susilawati, T. (2011). *Spermatology*. Malang: Universitas Brawijaya (UB) Press.
- Susilawati, T. (2013). *Pedoman inseminasi buatan pada ternak*. Malang: Universitas Brawijaya (UB) Press.
- Susilowati (2020). Pengaruh nutrisi terhadap pertumbuhan dan produktivitas sapi potong di Indonesia. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 25(2), 70-80.
- Susilowati, S., Hernawati, T., & Suprayogi, T.W. (2023). *Buku ajar inseminasi buatan edisi 2*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Toelihere, M.R. (1979). *Fisiologi reproduksi pada ternak*. Bandung: Angkasa.
- Toelihere, M.R. (1981). *Inseminasi buatan pada ternak*. Bandung: Angkasa.
- Vyklicka, L., & Lishko, P.V. (2020). Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum. *Current Opinion in Cell Biology*, 63(4), 154-161.
- Widiantoro, K., Madyawati, S.P., Sardjito, T., Hernawati, T., Triana, I.N., & Warsito, S.H. (2021). Kualitas post-thawing semen domba merino dalam bahan pengencer berbasis susu skim-kuning telur yang ditambah isolat crude protein tyrosine kinase. *Ovozoa*, 10(2), 39-45.

- Winton, T.S., Nicodemus, M.C., & Harvey, K.M. (2024). Stressors inherent to beef cattle management in the United States of America and the resulting impacts on production sustainability: A Review. *Ruminants*, 4, 227-240.
- Yulianto, P., & Suprianto, C. (2010). *Pembesaran sapi potong secara intensif*. Jakarta: Penerbit Swadaya.