

**INTERAKSI ANTARA LAMA WAKTU DAN JARAK STRAW DENGAN  
NITROGEN CAIR PADA PROSES *PRE FREEZING* TERHADAP  
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI**

(Skripsi)

Oleh

Siti Makrifat



**JURUSAN PETERNAKAN  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2019**

## **ABSTRACT**

### **INTERACTION BETWEEN LENGTH OF TIME AND DISTANCE OF STRAW WITH LIQUID NITROGEN IN THE PRE FREEZING PROCESS ON THE QUALITY OF FROZEN CEMENT OF BALI CATTLE**

**By**

**Siti Makrifat**

The aim of this research were knowing (a) interaction between length of time and distance of straw with liquid nitrogen in the pre freezing process on the quality of frozen cement of Bali cattle; (b) the effect of distance between straw and liquid nitrogen in the pre freezing process on the quality of frozen cement of Bali cattle;(c) knowing the effect of pre freezing time on quality of frozen cement of Bali cattlle. Factorial complete randomized design 3x3 with two treatment factors were used in this research. The treatment factors were pre freezing time (7 minutes, 9 minutes, and 11 minutes) and distance of straw with nitrogen liquid (4 cm, 6 cm, and 8 cm). Variables observed were the percentage of sperm motility, percentage of spermatozoa life, and percentage of sperm abnormalities. The data obtained were analyzed using variance analysis at the real level of 5 %. The results showed that there was no interaction between time and distance of straw with liquid nitrogen ( $P>0,05$ ) on percentage of spermatozoa motility, percentage of spermatozoa life, andpercentage of abnormalities spermatozoa.

**Keywords:**Bali cattle, Length of time of straw, Distance of straw, Pre freezing, Sperm motility,

## ABSTRAK

### INTERAKSI ANTARA LAMA WAKTU DAN JARAK STRAW DENGAN NITROGEN CAIR PADA PROSES *PRE FREEZING* TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI

Oleh

Siti Makrifat

Penelitian ini bertujuan untuk : 1) mengetahui interaksi antara lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali; 2) mengetahui pengaruh jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali; 3) mengetahui pengaruh lama waktu *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan acak lengkap (RAL) faktorial 3x3 dengan dua faktor perlakuan yaitu lama waktu *pre freezing* (7 menit, 9 menit, dan 11 menit) dan jarak straw dengan  $N_2$  cair (4 cm, 6 cm, dan 8 cm). Peubah yang diamati adalah persentase motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa dan persentase abnormalitas spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis ragam pada taraf nyata 5% atau 1%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antara lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair tidak terdapat interaksi ( $P>0,05$ ) terhadap persentase motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa, dan persentase abnormalitas spermatozoa. Lama waktu *pre freezing* tidak berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi Bali. Jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* tidak berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi Bali.

Kata kunci : kualitas semen, Sapi Bali, waktu dan jarak *pre freezing*

**INTERAKSI ANTARA LAMA WAKTU DAN JARAK STRAW DENGAN  
NITROGEN CAIR PADA PROSES *PRE FREEZING* TERHADAP  
KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI**

Oleh

**Siti Makrifat**

**SKRIPSI**

**Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar  
Sarjana Peternakan**

Pada

**Jurusan Peternakan  
Fakultasa Pertanian Universitas Lampung**



**JURUSAN PETERNAKAN  
FAKULTASA PERTANIAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
2019**

Judul Skripsi : **INTERAKSI ANTARA LAMA WAKTU DAN JARAK STRAW DENGAN NITROGEN CAIR PADA PROSES *PRE FREEZING* TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI**

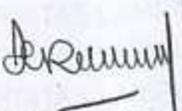
Nama Mahasiswa : **Siti Makrifat**

Nomor Pokok Mahasiswa : 1414141083

Program Studi : **Peternakan**

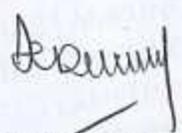
Fakultas : **Pertanian**



  
**Sri Suharyati, S. Pt., M. P.**  
NIP 19680728 199402 2 002

  
**drh. Madi Hartono, M. P.**  
NIP 19660708 199203 1 004

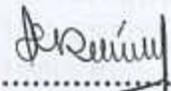
2. Ketua Jurusan Peternakan

  
**Sri Suharyati, S. Pt., M. P.**  
NIP 19680728 199402 2 002

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

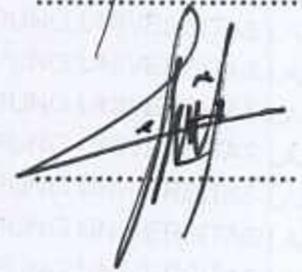
**Ketua : Sri Suharyati, S. Pt., M. P.**



**Sekretaris : drh. Madi Hartono, M. P.**



**Penguji  
Bukan Pembimbing : Siswanto, S. Pt., M. Si.**



**2. Dekan Fakultas Pertanian**



**Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M. Si.**  
NIP 19611020 198603 1 002



## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Desa Trimulyo, Sekampung, Lampung Timur pada 26 September 1995 sebagai anak pertama dari dua bersaudara pasangan Bapak Samaji dan Ibu Lasinem. Penulis menyelesaikan pendidikan sekolah dasar di SD N 2 Trimulyo, Trimulyo pada 2008, pendidikan sekolah menengah pertama di SMPN 1 Sekampung pada 2011, dan sekolah menengah atas di SMAN 1 Sekampung pada 2014.

Penulis terdaftar sebagai mahasiswa Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada tahun 2014 melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri. Penulis melakukan Praktik Umum (PU) pada Juli 2017 di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang, Jawa Barat. Selama menjadi mahasiswa penulis juga aktif mengikuti Unit Kegiatan Mahasiswa Paduan Suara (PSM) Unila sekaligus ikut serta dalam kompetisi yang diikuti PSM Unila pada 2014--2018.

*Orang yang lebih lambat meraih sebuah kesuksesan, akan sedikit lebih banyak  
mendapatkan suatu pengajaran dari pada orang yang lebih dulu meraih suatu  
kesuksesan*

*Mimpi tidak pernah menyakiti siapa pun jika dia terus bekerja tepat di belakang  
mimpinya untuk mewujudkannya semaksimal mungkin  
(f.w. woolworth)*

*Tidak apa-apa untuk merayakan kesuksesan tapi lebih penting untuk  
memperhatikan pelajaran tentang kegagalan  
(bill gates)*

*Kenapa khawatir..? jika anda telah melakukan yang terbaik yang anda bisa, maka  
khawatir tidak akan membuatnya menjadi lebih baik  
(walt disney)*

*Sepiro gedhineng sengsoro yen tinompo among dadi cobo  
Suro diro joyodiningrat, lebur dening pangastuti*

*Jadilah sosok terbaik, bukan sosok yang nomor 1. karena terbaik pasti selalu jadi  
nomor 1, tapi nomor 1 belum tentu jadi yang terbaik.*

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan rasa syukur yang besar kupersembahkan skripsi ini untuk kedua orang tuaku tercinta, Ayahanda Samaji dan Ibunda Lasinem yang telah membesarkan dan mendidikku dengan penuh kasih, keikhlasan hati dan kesabaran yang telah diberikan selama ini, serta adikku tersayang Ahmad Mudzakir yang telah memberikan motivasi, semangat, kasih sayang dan doa , tidak lupa teman-teman istiqlal tersayang yang telah memberikan dukungan, cinta, doa dan waktunya, semoga Allah SWT senantiasa menganugerahkan rahmat dan hidayahnya untuk kalian.

Teman-teman seperjuangan peternakan 2014 serta Almamater tercinta.

## **KATA PENGANTAR**

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M. Si., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung beserta seluruh staf dan jajarannya;
2. Ibu Sri Suharyati, S. Pt., M. P., selaku Pembimbing Utama dan Ketua Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung; atas ketersediaan, kesabaran memberikan bimbingan, arahan, saran, dan kritik kepada penulis dalam penyelesaian skripsi;
3. Bapak drh. Madi Hartono, M. P., selaku Pembimbing Anggota atas bantuan, bimbingan dan arahnya selama penulis menyelesaikan skripsi;
4. Bapak Siswanto, S. Pt., M. Si., selaku Penguji Utama sekaligus Pembimbing Akademik atas masukan dan saran dalam penyelesaian skripsi;
5. Ibu dan Bapak Dosen di Jurusan Peternakan atas ilmu yang telah diberikan;
6. Ayahanda Samaji dan Ibunda Lasinem yang telah membesarkan, mendidik, dan senantiasa memberikan, doa, kesabaran kasih sayang, dan semangat baik secara moril maupun materil serta dukungan yang tiada hentinya;

7. Adik tercinta Ahmad Mudzakir atas semangat, doa, dan motivasinya, serta untuk mbah lasmini, alm mbah pariyem dan semua keluarga yang telah memberikan dukungan ,semangat, dan doa yang tiada henti;
8. Bapak selaku kepala Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Lampung atas izin, fasilitas dan bantuannya selama penelitian;
9. Ibu Murtiawan, S.Pt., drh. Yudish , Bapak Ir. Joko, Bapak Pur, Mas Yasir atas bimbingan, saran, dan arahan selama pelaksanaan penelitian;
10. Teman-teman tersayang Istiqlal (Desi Savitri, Riska Munjiati, Deva Agustia, Winda Puspita Sari, Tri Isngatirah) atas semangat, dukungan, kasih sayang, persaudaraan, kesabaran, cinta dan doa nya yang tak pernah henti;
11. Seluruh rekan-rekan Peternakan angkatan 2014 , terima kasih atas persaudaraan, semangat, motivasi, dukungan, bantuan, dan kebersamaan yang sudah diberikan.

Semoga semua doa dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis mendapatkan balasan yang berlipat ganda dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi bagi kita semua. Amin.

Bandar Lampung, November 2018

Penulis

**Siti Makrifat**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>i</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>ii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
A. Latar Belakang dan Masalah.....	1
B. Tujuan Penelitian .....	4
C. Manfaat Penelitian .....	5
D. Kerangka Pemikiran .....	5
E. Hipotesis .....	8
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>9</b>
A. Sapi Bali .....	9
B. Semen Beku. ....	9
C. Kualitas Semen Beku Sapi.....	11
D. Pembekuan Semen .....	16
E. Jarak Straw pada Proses <i>Pre Freezing</i> .....	18
F. Waktu <i>Pre Freezing</i> .....	18
G. Evaluasi Post Thawing.....	19

<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>21</b>
A. Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
B. Bahan dan Alat Penelitian.....	21
1 Bahan penelitian.....	21
2 Alat penelitian. ....	21
C. Rancangan Percobaan. ....	22
D. Prosedur Penelitian.....	22
1 Koleksi dan penampungan semen.....	23
2 Evaluasi semen segar .....	24
3 Pengenceran semen .....	24
4 <i>Ekuilibrasi</i> .....	25
5 Pemeriksaan pasca <i>ekuilibrasi</i> .....	25
6 <i>Filling</i> dan <i>sealing</i> .....	26
7 Proses <i>Pre freezing</i> .....	26
8 Evaluasi <i>pre freezing</i> .....	27
9 Proses <i>freezing</i> .....	27
10 Evaluasi <i>post thawing</i> .....	27
E. .Peubah yang Diamati. ....	28
1. Motilitas spermatozoa .....	28
2. Presentase spermatozoa hidup.....	29
3. Presentase abnormalitas. ....	29
F. Analisis Data.....	30

<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>31</b>
A. Penilaian Kualitas Semen Segar. ....	31
B. Penilaian Kualitas Semen setelah <i>Ekuilibrasi</i> .....	33
C. Interaksi Antara Lama Waktu dan Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses <i>Pree Freezing</i> terhadap Persentase Motilitas Spermatozoa. ....	35
D. Interaksi antara Lama Waktu dan Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses <i>Pree Freezing</i> Terhadap Persentase Motilitas Spermatozoa setelah <i>Freezing</i> .....	39
E. Interaksi Antara Lama Waktu dan Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses <i>Pree Freezing</i> terhadap Persentase Hidup Spermatozoa setelah <i>Pre Freezing</i> .....	41
F. Interaksi Antara Lama Waktu dan Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses <i>Pree Freezing</i> terhadap Persentase Hidup Spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	45
G. Interaksi Antara Lama Waktu dan Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses <i>Pree Freezing</i> terhadap Persentase Abnormalitas Spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> .....	48
H. Interaksi Antara Lama Waktu dan Jarak Straw dengan Nitrogen Cair pada Proses <i>Pree Freezing</i> terhadap Persentase Abnormalitas Spermatozoa setelah <i>freezing</i> . ....	51
<b>V. SIMPULAN .....</b>	<b>54</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA. ....</b>	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil evaluasi kualitas semen segar.....	32
2. Kualitas semen setelah <i>ekuilibrasi</i> .....	34
3. Persentase motilitas spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> .....	36
4. Persentase motilitas spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	39
5. Persentase hidup spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> .....	42
6. Persentase hidup spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	45
7. Presentase abnormalitas spermatozoa setelah <i>Pre freezing</i> .....	48
8. Persentase abnormalitas spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	51
9. Hasil analisis persentase motilitas spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> ....	61
10. Hasil analisis persentase motilitas spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	61
11. Hasil analisis persentase hidup mati spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> ....	61
12. Hasil analisis persentase hidup mati spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	62
13. Hasil analisis persentase abnormalitas spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> ...	62
14. Hasil analisis persentase abnormalitas spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	62

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Prosedur kerja penelitian.....	23
2. Persentase motilitas spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> .....	36
3. Persentase motilitas spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	40
4. Persentase hidup spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> .....	43
5. Persentase hidup spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	45
6. Persentase abnormalitas spermatozoa setelah <i>pre freezing</i> .....	49
7. Persentase abnormalitas spermatozoa setelah <i>freezing</i> .....	52
8. Penampungan semen.....	63
9. Penghitungan konsentrasi spermatozoa.....	63
10. Evaluasi semen.....	64
11. Pembuatan bahan pengencer.....	64
12. Pengukuran jarak pada sterofoam.....	65
13. Pemasangan kawat.....	65
14. Mesin <i>filling sealing</i> .....	66
15. Ekuilibrasi.....	66
16. <i>Pre freezing</i> .....	67
17. <i>Thawing</i> .....	67

18. <i>Freezing</i> .....	68
19. Pembuatan preparat ulas.....	68
20. Preparat ulas.....	69
21. Pengamatan.....	69

## **I. PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang dan Masalah**

Terbatasnya populasi sapi saat ini tidak sebanding dengan permintaan yang terus meningkat pada produk daging sapi di Indonesia. Hal ini dipengaruhi juga oleh ketersediaan sapi bakalan yang terbatas sehingga sangat sulit untuk mewujudkan pemenuhan kebutuhan daging nasional. Salah satu sarana guna terwujudnya peningkatan populasi dan mutu genetik sapi maka dilakukan pemanfaatan bioteknologi reproduksi peternakan melalui teknik Inseminasi Buatan (IB). Dalam teknik IB ini semen yang dipakai harus memiliki kualitas yang baik agar proses pelaksanaan IB berjalan dengan baik dan dapat dilakukan secara maksimal.

Sapi Bali merupakan salah satu sapi potong dari empat bangsa sapi lokal utama (Aceh, Pesisir, Madura, dan Bali) yang ada di Indonesia. Sapi Bali juga merupakan rumpun sapi asli Indonesia yang mempunyai karakteristik fisik dan komposisi genetik serta memiliki kemampuan adaptasi pada berbagai lingkungan di Indonesia. Wahyuni (2000) mengatakan bahwa Sapi Bali memiliki beberapa keunggulan karakteristik yaitu mempunyai fertilitas tinggi, lebih tahan terhadap kondisi lingkungan yang kurang baik, cepat beradaptasi apabila dihadapkan dengan lingkungan baru, dan cepat berkembang biak. Keunggulan yang dimiliki

sapi Bali sangat penting untuk dikembangkan sebagai salah satu sumber daging sapi dalam negeri yang berperan untuk memenuhi kebutuhan daging nasional.

Semen beku memiliki keunggulan dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama namun memiliki kelemahan yaitu kualitas semen setelah pembekuan dapat menurun. Semen beku berasal dari pejantan sapi unggul yang sehat yang diencerkan dengan menggunakan pengencer organik atau anorganik dengan jumlah sel spermatozoa minimal 25 juta/straw untuk mini straw dan 30-50 juta/straw untuk medium straw. Kualitas semen beku sesudah dicairkan kembali (*post thawing*) pada suhu 37°C selama 30 detik harus menunjukkan spermatozoa hidup dan bergerak maju (motil spermatozoa) minimal 40 % (empat puluh persen) dan gerakan individu spermatozoa minimal 2 (dua) (Standar Nasional Indonesia Semen Beku, 2008). Spermatozoa mudah mengalami kerusakan pada saat perlakuan maupun penyimpanan dalam keadaan beku, oleh karena itu, mutu semen beku harus selalu terjaga agar fertilitasnya tetap terjaga dengan baik.

Pada saat diproses menjadi semen beku, semen segar membutuhkan proses yang sangat panjang dari mulai proses koleksi hingga penanganan di dalam laboratorium dan menjadi semen beku yang siap digunakan untuk IB. Dalam prosesing semen beku, tahap-tahap yang perlu diperhatikan yaitu pada tahap *pre-freezing* dan *freezing* semen. *Pre-freezing* merupakan proses pembekuan semen dengan suhu tertentu sampai mencapai suhu yang diinginkan. *Pre-freezing* merupakan tahap pembekuan awal semen beku yang akan mempengaruhi kualitas semen yang dibekukan, seperti gerakan individu atau daya gerak spermatozoa, persentase hidup, dan abnormalitas spermatozoa.

Proses pembekuan biasanya menyebabkan *cold shock* karena adanya tekanan udara yang drastis sehingga spermatozoa banyak mengalami kematian dan perubahan intraseluler karena adanya pembentukan kristal-kristal es. Proses *pre freezing* dilakukan untuk meminimalisir terjadi *cold shock* pada semen yang akan dibekukan dalam proses *freezing*. Proses penanganan yang salah akan menyebabkan semen banyak mengalami *cold shock* atau tekanan dingin sehingga semen mengalami kerusakan. Lama waktu *pre freezing* menurut beberapa sumber berbeda. Menurut BIB Ungaran (2011), straw yang telah berisi semen diletakkan pada permukaan nitrogen cair 4 cm dengan suhu berkisar  $-110^{\circ}\text{C}$  sampai  $-120^{\circ}\text{C}$  selama 9 menit. Salamon (1971) menunjukkan ketika semen (0,03 ml) yang diuapkan di atas permukaan nitrogen cair (*pre freezing*) selama 9 menit sebelum dimasukkan ke dalam nitrogen cair akan mempertahankan persentase gerakan individu spermatozoa setelah diperiksa *post thawing motility*.

Peraturan Direktur Jenderal Peternakan Nomor :1220/HK.060/F/12/2007 tentang Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku menyatakan proses *pre freezing* dilakukan dalam storage kontainer, straw disusun dirak dan dilakukan 2—4 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 5—9 menit, sedangkan di Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Lampung melakukan proses *pre freezing* dengan jarak straw di atas permukaan nitrogen cair yang diterapkan yaitu 4 cm selama 9 menit. Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari melakukan proses *pre freezing* straw yang berisi semen diatur pada rak straw dan ditempatkan dalam uap nitrogen cair sekitar 4,5 cm di atas permukaan nitrogen cair selama 10 menit, kemudian dimasukkan langsung ke dalam nitrogen cair.

Jarak antara straw dengan nitrogen cair pada *pre freezing* juga mempengaruhi kualitas semen yang dibekukan. Menurut pendapat Kaiin *et. al.* (2004), bahwa ketinggian straw dari permukaan nitrogen cair sebesar 10 cm dengan volume nitrogen cair delapan liter menghasilkan motilitas spermatozoa sebesar 43%, spermatozoa hidup sebesar 39%. Feradis (2010) menyatakan bahwa pembekuan semen dalam straw ini dapat dilakukan dengan menempatkan straw pada uap nitrogen cair dan kecepatan pendinginan diatur dengan mengontrol jarak straw dengan permukaan nitrogen cair. Lama waktu *pre freezing* menurut beberapa sumber adalah beragam. Straw yang telah diisi semen diletakkan pada permukaan nitrogen cair  $\pm 4$  cm dengan suhu berkisar antar  $-110^{\circ}\text{C}$  sampai  $-120^{\circ}\text{C}$  selama 9 menit (BIB Ungaran, 2011).

Sampai saat ini belum banyak informasi lebih lanjut mengenai lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair yang terbaik terhadap kualitas semen beku sapi Bali setelah pembekuan sehingga perlu dilakukan penelitian lama waktu dan jarak straw yang terbaik dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku.

## **B. Tujuan Penelitian**

Tujuan dalam penelitian ini adalah:

1. mengetahui interaksi antara lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali
2. mengetahui pengaruh lama waktu *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali

3. mengetahui pengaruh jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali

### **C. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi yang bermanfaat kepada petugas laboratorium di berbagai Balai Inseminasi Buatan mengenai lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair yang terbaik pada proses *pre freezing*.

### **D. Kerangka Pemikiran**

Sapi Bali adalah jenis sapi potong asli Indonesia yang berpotensi besar untuk terus dikembangkan. Handiwirawan dan Subandriyo (2004) menyatakan bahwa sapi Bali memiliki beberapa keunggulan karakteristik yaitu memiliki daya adaptasi tinggi terhadap lingkungan yang kurang baik, dapat memanfaatkan pakan dengan kualitas rendah, mempunyai fertilitas tinggi dan nilai *conception rate* yang sangat baik, persentase karkas tinggi yaitu 52-57,7%, dan memiliki daging dengan kadar lemak rendah (kurang lebih 4%).

Semen beku adalah semen yang disimpan pada suhu di bawah titik beku yaitu antara  $-79^{\circ}\text{C}$  sampai  $-196^{\circ}\text{C}$ . Kelebihan semen beku adalah dapat disimpan lama dengan daya membuahi yang tetap baik, tidak ada semen beku yang terbuang walau sudah lama disimpan, dan semen beku dapat dikirim dengan jarak pengiriman yang jauh dan waktu pengiriman yang lama (Hardijanto *et al.*, 2010). *Pre freezing* merupakan salah satu tahapan proses pembekuan. Proses dalam

*pre freezing* dilakukan dengan cara meletakkan straw pada uap nitrogen cair, menggunakan *boks styrofoam* yang berukuran panjang x lebar x tinggi masing-masing 60 x 40 x 30 cm dengan suhu  $-110^{\circ}\text{C}$  sampai  $-120^{\circ}\text{C}$  selama 9 menit. Suhu tersebut diperoleh bila straw yang disusun di atas rak yang ditempatkan kurang lebih 4 cm di atas permukaan nitrogen cair. Hal ini bertujuan sebagai proses adaptasi semen untuk tahap selanjutnya, supaya tidak terjadi *temperatur shock* yang dapat menyebabkan abnormalitas atau kematian spermatozoa di dalam semen. Setelah pembekuan, semen beku disimpan di dalam *storage* kontainer yang berisi nitrogen cair  $-196^{\circ}\text{C}$  (Nilna, 2010).

Pembekuan semen dibagi ke dalam dua tahap, yaitu proses *pre freezing* dan *freezing* straw. Pada proses pembekuan semen ini biasanya akan mengakibatkan terjadinya *cold shock* dan perubahan intraseluler yang berkaitan dengan pembentukan kristal-kristal es. Proses pembekuan menyebabkan membran plasma rusak sebagai akibat terbentuknya peroksidasi lipid yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi membran dan ketika dicairkan menyebabkan perubahan aktivitas protein dan perubahan permeabilitas terhadap air dan zat terlarut. Menurut Parrish (2003), semen akan mengalami penurunan kualitas sekitar 10 – 40% pada saat pembekuan.

Banyak faktor yang dapat mempengaruhi terjadinya penurunan kualitas semen pada saat proses pembekuan semen, salah satunya yaitu lama waktu yang digunakan dalam proses *pre freezing* straw. Lama waktu yang tidak sesuai bagi semen akan menyebabkan terjadinya *cold shock*, sehingga menyebabkan kualitas semen akan menurun. Hal tersebut karena adanya penurunan suhu yang terlalu

cepat atau terlalu lambat sehingga kurangnya waktu adaptasi spermatozoa terhadap suhu dingin sebelum dimasukkan ke dalam nitrogen cair ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) menyebabkan spermatozoa banyak mengalami kerusakan akibat *cold shock* dan perubahan-perubahan intraseluler yang berkaitan dengan pembentukan kristal-kristal es, sedangkan yang terlalu lama menyebabkan gliserol akan menarik air secara berlebihan dan menyebabkan dehidrasi sel sehingga terjadi kerusakan sel spermatozoa. Menurut Pratiwi *et. al.* (2014), bahwa persentase spermatozoa hidup tertinggi yaitu 50,74% diperoleh pada perlakuan waktu *pre freezing* selama 9 menit dan terendah 17,15% diperoleh pada perlakuan waktu *pre freezing* selama 5 menit.

Pada proses pembekuan, jarak straw nitrogen cair akan memengaruhi kualitas semen beku setelah pembekuan. Menurut Said *et. al.* (2004), ketinggian straw dari permukaan nitrogen cair sebesar 10 cm dengan volume nitrogen cair delapan liter menghasilkan motilitas sperma sebesar 43% sehingga layak digunakan dalam proses IB karena masih diatas nilai minimal 40% yang ditentukan oleh Badan Standarisasi Nasional tahun 1998. Persentase motilitas spermatozoa tertinggi yaitu 40% diperoleh dari perlakuan jarak straw 4 cm dan 6 cm, sedangkan persentase motilitas spermatozoa terendah yaitu 5% dihasilkan oleh perlakuan jarak straw 2 cm. Hal ini disebabkan karena proses pembekuan dapat menyebabkan perubahan kualitas semen beku yang dihasilkan. Rendahnya motilitas spermatozoa setelah *thawing* disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kerusakan bahkan terjadi kematian akibat penurunan suhu terlalu cepat (Aini *et. al.* 2014).

Menurut Imran (2012), jarak ketinggian straw dengan permukaan nitrogen cair sangat berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa semen beku. Jarak ketinggian yang memberikan hasil motilitas spermatozoa yang baik pada jarak ketinggian straw dengan permukaan nitrogen cair 2 cm. Interaksi antara kedua faktor lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair diharapkan dapat mengurangi atau bahkan dapat mempertahankan kualitas semen beku pada proses *pre freezing*.

### **E. Hipotesis**

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

1. terdapat interaksi antara lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali;
2. terdapat pengaruh lama waktu *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali;
3. terdapat pengaruh jarak straw dengan nitrogen pada proses *pre freezing* terhadap kualitas semen beku sapi Bali.

## **II. TINJAUAN PUSTAKA**

### **A. Sapi Bali**

Sapi Bali merupakan salah satu jenis sapi lokal Indonesia yang berasal dari Bali yang sekarang telah menyebar hampir ke seluruh penjuru Indonesia bahkan sampai luar negeri seperti Malaysia, Filipina, dan Australia (Oka, 2010).

Sapi Bali memiliki keunggulan dibandingkan dengan sapi lainnya antara lain mempunyai angka pertumbuhan yang cepat, adaptasi dengan lingkungan yang baik, dan penampilan reproduksi yang baik. Sapi Bali merupakan sapi yang paling banyak dipelihara pada peternakan kecil karena fertilitasnya baik dan angka kematian yang rendah (Purwantara *et al.*, 2012).

Sapi Bali mempunyai ciri-ciri khusus antara lain: warna bulu merah bata, tetapi yang jantan dewasa berubah menjadi hitam (Hardjosubroto, 1994). Sapi Bali merupakan sapi potong asli Indonesia dan merupakan hasil domestikasi dari Banteng (*Bos-bibos banteng*) (Hardjosubroto, 1994).

### **B. Semen Beku**

Inseminasi buatan (IB) adalah salah satu bentuk bioteknologi dalam bidang reproduksi ternak yang memungkinkan untuk mengawinkan ternak betina yang

dimilikinya tanpa perlu seekor pejantan, dalam penggunaannya dapat memanfaatkan pejantan yang memiliki pejantan potensi genetik unggul (Wuragil, 2008).

Semen beku adalah semen yang telah diencerkan kemudian dibekukan di bawah suhu  $0^{\circ}\text{C}$  atau titik beku air. Pembekuan semen merupakan usaha untuk menjamin daya tahan spermatozoa dalam waktu yang lama, melalui proses pengolahan, pengawetan, dan penyimpanan semen sehingga dapat digunakan pada suatu waktu sesuai kebutuhan (Graha, 2005). Semen beku sapi merupakan semen yang berasal dari pejantan sapi terpilih yang diencerkan sesuai prosedur proses produksi sehingga menjadi semen beku dan disimpan dalam rendaman nitrogen cair pada suhu  $-196^{\circ}\text{C}$  pada kontainer (SNI 01.4869. 1-2005).

Semen beku adalah semen yang telah diencerkan menurut prosedur dengan tujuan untuk menyediakan makanan bagi spermatozoa dan meningkatkan volume dengan menurunkan konsentrasi semen sehingga didapat 25 juta sel spermatozoa dalam satu straw yang sebelumnya telah dilakukan pemeriksaan saat semen segar, kemudian dibekukan jauh dari titik  $0^{\circ}\text{C}$  tergantung pada zat yang dipakai untuk membekukan semen tersebut. Pembekuan bisa menggunakan es kering, cairan udara,  $\text{O}_2$  cair, dan nitrogen cair. nitrogen cair yang populer digunakan sebab dapat membekukan pada suhu yang paling rendah dan dapat menyimpan semen dalam waktu yang lama. Kombinasi es kering dan kristal  $\text{CO}_2$  dapat mencapai titik  $-70^{\circ}\text{C}$ , cairan nitrogen suhunya  $-196^{\circ}\text{C}$ , sedangkan  $\text{CO}_2$  cair, dan udara cair suhunya  $-190^{\circ}\text{C}$  (Partodiharjo, 1992).

### C. Kualitas Semen Beku Sapi

Banyak hal-hal yang dapat menyebabkan rendahnya kualitas semen beku terutama terhadap motilitas diantaranya suhu dan kelembaban, *thawing*, jarak straw, cara penyimpanan semen beku, dan penambahan nitrogen cair. Suhu berperan sangat besar dalam menentukan motilitas sebab kadar metabolisme dan motilitas spermatozoa berbeda (Toelihere, 1993).

Penilaian gerakan individual spermatozoa menggunakan mikroskop dan melihat pola pergerakan progresif atau gerakan aktif maju ke depan merupakan gerakan terbaik. Gerakan melingkar atau gerakan mundur merupakan tanda *cold shock* atau media yang kurang isotonik terhadap semen. Gerakan berayun dan berputar-putar di tempat biasanya terlihat pada semen yang sudah tua dan apabila kebanyakan spermatozoa berhenti bergerak dan dianggap mati. Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme spermatozoa yang ditunjang oleh lingkungan yaitu suhu dan komponen-komponen yang terdapat di dalam medium (Toelihere, 1993).

Persentase motilitas spermatozoa Sapi Limousin setelah *pre freezing* berkisar antara 40—50% (Aini *et al.*, 2004). Gerakan massa spermatozoa yang normal berkisar antara (++) dan (+++) (Toelihere, 1985).

Gerakan spermatozoa normal pada umumnya adalah pergerakan progresif atau gerakan aktif maju ke depan. Gerakan melingkar dan gerakan mundur merupakan tanda-tanda akibat dari *cold shock*. Gerakan berputar di tempat sering terlihat pada semen yang sudah tua, apabila banyak spermatozoa yang telah

berhenti bergerak maka dianggap mati (Feradis, 2010).

Motilitas spermatozoa dapat dilihat melalui pengamatan secara mikroskopis.

Semen yang diperoleh diletakan dalam preparat yang dibuat diatas gelas obyek kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 x 10. Preparat semen tersebut dinilai untuk mengetahui gerakan individu spermatozoa di dalam semen. Standar penilaian gerakan individu yang terlihat pada mikroskop adalah

0 % : spermatozoa tidak bergerak;

0--30 % : gerakan berputar ditempat; pergerakan progresif;

30--50 % : gerakan berayun atau melingkar; pergerakan progresif;

50--80 % : ada gerakan massa; pergerakan progresif;

80--90 % : ada gelombang; pergerakan progresif;

90--100 % : gelombang sangat cepat; pergerakan sangat progresif,

(Toelihere, 1981).

Terdapat tiga tipe pergerakan spermatozoa yaitu pergerakan progresif (maju ke depan), pergerakan rotasi (gerakan berputar), dan osilator atau konvulsif tanpa pergerakan ke depan atau perpindahan posisi (Evans dan Maxwell, 1997).

Pendinginan dan pemanasan kembali akan merusak lipoprotein yang ada pada membran sperma (Gillan *et al.* 2004)

Motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh kemampuan metabolisme spermatozoa yang ditunjang oleh lingkungan yaitu suhu dan komponen-komponen di dalam medium pengencer (Toelihere, 1993).

Motilitas spermatozoa mengalami penurunan setelah *pre freezing* yaitu dari 75% menjadi 40%. Hal ini diduga karena terjadi kerusakan membran plasma yang menyebabkan motilitas spermatozoa menurun (Aini *et al.*, 2004)

Penurunan motilitas spermatozoa setelah pendinginan diduga karena turunnya kandungan phospholipid yang merupakan komponen membran sel spermatozoa. Phospholipid berfungsi untuk melindungi sel spermatozoa dari *cold shock* (Situmorang, 2002)

Pergerakan gerak individu ini sangat dipengaruhi oleh peneliti terutama keterampilan dan pengalaman dari pemeriksaan secara mikroskopis. Oleh karena itu penelitian dari seseorang dengan orang lain berbeda (Susilawati *et al.*, 2003).

Proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH. Kondisi ini dapat bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa (Sugiarti *et al.*, 2004),

Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein pada dinding sel spermatozoa sehingga permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. Kerusakan membran plasma spermatozoa pada saat proses pembekuan semen juga terjadi akibat terbentuknya peroksidasi lipid.

Membran plasma spermatozoa banyak mengandung asam lemak tidak jenuh yang sangat rentan terhadap kerusakan peroksidasi tersebut (Maxwell dan Watson, 1996).

Persentase spermatozoa hidup tinggi serta gerak progresif dan kuat merupakan tanda semen berkualitas baik. Persentase spermatozoa hidup dan mati dapat ditentukan melalui cara pewarnaan. Perbedaan penyerapan zat warna antara sel-sel spermatozoa mati dan hidup dapat digunakan menghitung secara objektif jumlah spermatozoa hidup atau mati, sewaktu semen dicampur dengan zat warna, maka spermatozoa hidup (viabil) tidak akan menyerap warna karena membrannya masih bagus. Spermatozoa yang motil dan hidup tidak berwarna (Suyadi dan Susilawati, 1992).

Penurunan motilitas spermatozoa setelah *pre freezing* diduga karena turunnya kandungan phospholipid dan kolesterol. Kedua senyawa tersebut merupakan komponen membran. Phospholipid berfungsi untuk melindungi sel spermatozoa dari *cold shock*, sedangkan kolesterol berperan penting dalam menjaga integritas sel spermatozoa dari variasi sistem membran yang bertambah selama proses *pre freezing* (Situmorang, 2002).

Proses perhitungan sel yang hidup dilakukan dengan cara membuat preparat ulas menggunakan pengecatan eosin sebesar 2%. Pada gelas obyek larutan eosin ditetaskan kemudian dicampur dengan satu tetes semen hingga homogen. Setelah itu dibuat menjadi preparat ulas tipis dengan cara menempelkan ujung kaca penutup pada kedua cairan sehingga cairan tersebut tercampur homogen. Setelah itu didorong gelas penutup ke ujung gelas obyek sehingga terbentuk lapisan tipis dan dikeringkan menggunakan pengering. Proses evaluasi dilakukan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran obyektif 10 x 40 (40 kali).

Spermatozoa yang mati dan hidup memiliki perbedaan diantaranya spermatozoa

hidup akan terlihat tidak berwarna dan untuk spermatozoa mati akan berwarna merah muda atau merah karena dindingnya menyerap warna akibat permeabilitas dindingnya meningkat. Proses pengamatan dapat dilakukan dengan membedakan sel yang hidup dan mati dengan jumlah minimal sel yang diamati sebanyak 200 sel. Perhitungan spermatozoa hidup dapat dilakukan dengan cara :

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

(Kristanto, 2004).

Abnormalitas merupakan suatu penyimpangan morfologis yang dapat menurunkan fertilitas semen (Butar-butur, 2009). Semen yang masih layak diinseminasikan yaitu memiliki nilai abnormalitas spermatozoa <20% (Partodihardjo, 1992).

Abnormalitas primer meliputi kepala yang terlampau besar (*macrocephalic*), kepala terlampau kecil (*microcephalic*), kepala pendek melebar, pipih memanjang, kepala rangkap, ekor ganda, bagian tengah melipat, membengkok, membesar, ekor melingkar, putus atau terbelah. Abnormalitas sekunder meliputi ekor yang putus, kepala tanpa ekor, bagian tengah yang melipat (Toelihere, 1985).

Abnormalitas sekunder disebabkan karena gangguan sperma setelah meninggalkan *tubulus seminiferi* contohnya seperti pada saat pematangan, gangguan mekanis akibat penanganan dan *temperature shock* (Suyadi dan Susilawati, 1992).

Setiap spermatozoa yang abnormal tidak dapat membuahi ovum, tanpa memandang apakah abnormalitas tersebut terjadi di dalam *tubulus seminiferi* atau

di dalam saluran kelamin jantan atau waktu ejakulasi (Partodiharjo, 1992).

Persentase abnormalitas spermatozoa dihitung menggunakan preparat ulas yang diwarnai dengan eosin-negrosin (Aminasari, 2009).

#### **D. Pembekuan Semen**

Proses pembuatan semen beku terdiri dari: (1) proses pengenceran, yaitu perhitungan volume pengencer dan proses pengenceran dengan pengencer organik (*skim milk*) ataupun anorganik (tris); (2) pemeriksaan *before freezing*, setelah proses pengenceran selesai maka dilakukan pemeriksaan secara mikroskopik terhadap motilitas sel spermatozoa yang bergerak aktif maju ke depan (progresif) dengan nilai minimal 70%; (3) proses *filling* dan *sealing*, dilakukan di dalam *cool top* yang bersuhu  $3 - 5^{\circ}\text{C}$ ; (4) *pre freezing*, straw yang telah dikemas disusun di atas rak, kemudian diletakkan di atas nitrogen cair dalam kontainer, prosesing sampai suhunya mencapai  $-140^{\circ}\text{C}$ , yang membutuhkan waktu selama 9 menit; (5) *freezing* (pembekuan), straw dimasukkan ke dalam goblet dan setelah itu direndam dalam nitrogen cair  $-196^{\circ}\text{C}$  dalam kontainer. Proses pembekuan semen meliputi:

1. *Cooling* (pendinginan) merupakan proses pendinginan semen setelah proses pengenceran, dimasukkan dalam gelas ukur tertutup dan ditempatkan pada *beaker glass* berisi air. *Cooling* sampai  $5^{\circ}\text{C}$  dapat dilakukan dengan memasukkan tabung-tabung yang berisi semen yang telah diencerkan dalam bak yang berisi air (Toelihere, 1985).

2. *Pre freezing* (pembekuan awal) yaitu straw yang berisi semen diatur pada

rak straw dan ditempatkan dalam uap nitrogen cair sekitar 4,5 cm di atas permukaan nitrogen cair. Pembekuan ini berlangsung sekitar 10 menit, kemudian dimasukkan langsung ke dalam nitrogen cair (Toelihere, 1985).

### 3. *Freezing* (pembekuan)

*Freezing* merupakan proses penghentian sementara kegiatan hidup sel tanpa mematikan fungsi sel dan proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan sedangkan semen beku adalah semen yang telah diencerkan menurut prosedur lalu dibekukan di bawah suhu  $0^{\circ}\text{C}$  atau titik beku air (Partodiharjo, 1992).

Pembekuan dapat menggunakan  $\text{CO}_2$  padat, udara basah,  $\text{O}_2$  cair dan nitrogen cair. Pembekuan dengan nitrogen cair lebih sering digunakan karena suhunya yang sangat rendah dapat menyimpan semen dalam jangka waktu yang lama. Pada proses ini straw direndam dengan suhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Volume nitrogen cair harus dikontrol secara periodik, karena jika kehabisan akan menaikkan suhu sehingga akan mematikan spermatozoa. Untuk menjamin kelangsungan hidup spermatozoa yang terkandung di dalam straw maka nitrogen cair di dalam kontainer tidak boleh kurang dari ukuran minimal yang ditentukan yaitu setinggi 13,3 cm. Seandainya 13,3 cm, maka penambahan  $\text{N}_2$  cair harus dilakukan segera dalam waktu 12 jam (Toelihere, 1993),

Tahapan *freezing* dilakukan dengan mencelupkan straw yang berisi semen ke dalam nitrogen cair yang bersuhu  $-196^{\circ}\text{C}$ . Tujuan dari proses ini untuk penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati, 2000).

### **E. Jarak straw pada proses *pre freezing***

Ketinggian straw dari permukaan nitrogen cair sebesar 10 cm dengan volume nitrogen cair delapan liter menghasilkan motilitas spermatozoa sebesar 43%, spermatozoa hidup sebesar 39% (Kaiin *et al.*, 2004),

Jarak straw 2 cm memiliki nilai motilitas yang rendah yaitu 14,12%, namun meningkat pada jarak straw 4 cm dengan nilai motilitas 27,62% kemudian mengalami peningkatan lagi pada jarak straw 6 cm dengan nilai motilitas spermatozoa 34%. Pada jarak straw 8 cm mengalami penurunan motilitas spermatozoa yaitu 33,26% dan terjadi penurunan kembali pada jarak straw 10 cm yaitu 25,4% (Aini *et al.*, 2014).

Pada jarak straw 6 cm dari permukaan nitrogen cair merupakan jarak straw yang terbaik terhadap motilitas spermatozoa setelah *thawing*. Hal ini diduga jarak straw 6 cm tidak mengalami penurunan suhu secara drastis sehingga spermatozoa tidak banyak mengalami kerusakan akibat *cold shock* (Aini *et al.*, 2014).

### **F. Waktu *Pre freezing***

Proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH. Kondisi ini dapat bersifat racun bagi spermatozoa yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa (Sugiarti *et al.*, 2004). Straw yang telah diisi semen di atas

permukaan nitrogen cair  $\pm 4$  cm dengan suhu berkisar antar  $-110^{\circ}\text{C}$  s/d  $-120^{\circ}\text{C}$  selama 9 menit (BIB Ungaran, 2011).

Proses *pre freezing* selama 9 menit memberikan pengaruh yang baik terhadap kualitas semen beku Sapi Simmental yang menggunakan pengencer Andromed® sehingga semen beku yang dihasilkan memenuhi syarat untuk dipergunakan dalam inseminasi buatan yaitu mempunyai persentase motilitas *post thawing* sebesar 40% (Pertiwi, *et al*, 2014)

Rata-rata persentase spermatozoa hidup tertinggi yaitu 50,74% diperoleh pada perlakuan waktu *pre freezing* selama 9 menit dan terendah 17,15% diperoleh pada perlakuan waktu *pre freezing* selama 5 menit (Pertiwi, *et al*, 2014).

### **G. Evaluasi *Post Thawing***

Evaluasi motilitas spermatozoa *post thawing* adalah salah satu parameter yang banyak digunakan untuk menentukan kualitas semen sapi yang akan digunakan untuk Inseminasi Buatan. Syarat minimal motilitas individu semen *post thawing* agar semen dapat dipergunakan dalam Inseminasi Buatan adalah 40% (Garner dan Hafez, 2000).

Proses fertilisasi membutuhkan spermatozoa motil sekitar sepuluh juta spermatozoa, maka syarat spermatozoa sebagai standar inseminasi adalah  $2,5 \times 10^7$  spermatozoa per straw dengan motilitas 40% (Susilawati *et al.*, 2003)

Metode *thawing* yang tidak tepat dapat menurunkan kualitas spermatozoa dan mempengaruhi kualitas IB sehingga perlu dilakukan evaluasi terhadap semen yang telah di-*thawing* (Tambing *et al.*, 1999).

Pengambilan semen dari kontainer menggunakan tangan juga dapat menurunkan kualitas karena perubahan suhu dari  $-196^{\circ}\text{C}$  ke tubuh manusia menjadi  $37^{\circ}\text{C}$  menyebabkan metabolisme spermatozoa menjadi lebih cepat. Hal ini menyebabkan produksi asam laktat yang bersifat *toxic* meningkat sehingga menyebabkan penurunan daya gerak spermatozoa hingga menyebabkan kematian (Watson, 1996).

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada Mei 2018 di BIBD Lampung, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung.

#### **B. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **1 Bahan penelitian**

Bahan yang digunakan adalah semen segar sapi Bali, zat pewarna (eosin), NaCl fisiologik, NaCl 3%, bahan pengencer yang terdiri dari tris kuning telur (20 %), fruktosa (2,5%), asam sitrat (0,88 %), antibiotik (*penisilin* (100.000 IU/100 ml), dan *streptomisin* (0,1 %), gliserol (6,5%), *aquabidestilata* (80 %), dan nitrogen cair.

##### **2 Alat penelitian**

Peralatan yang digunakan adalah vagina buatan, tabung penampung berskala, labu didih dan penangas, timbangan elektrik, termometer, spatula, corong, gelas ukur dan tutupnya, kertas label, kertas *whatman*, *waterbath*, *object* dan *cover glass*, *spektrofotometer*, *micropipet*, *beaker glass*, mesin *filling and sealing*, pH

meter, boks untuk *pre freezing* dan *freezing*, mikroskop, air hangat untuk proses *thawing*, tisu, *counter number*, *stopwatch*, *hairdryer* dan kontainer, serta alat tulis.

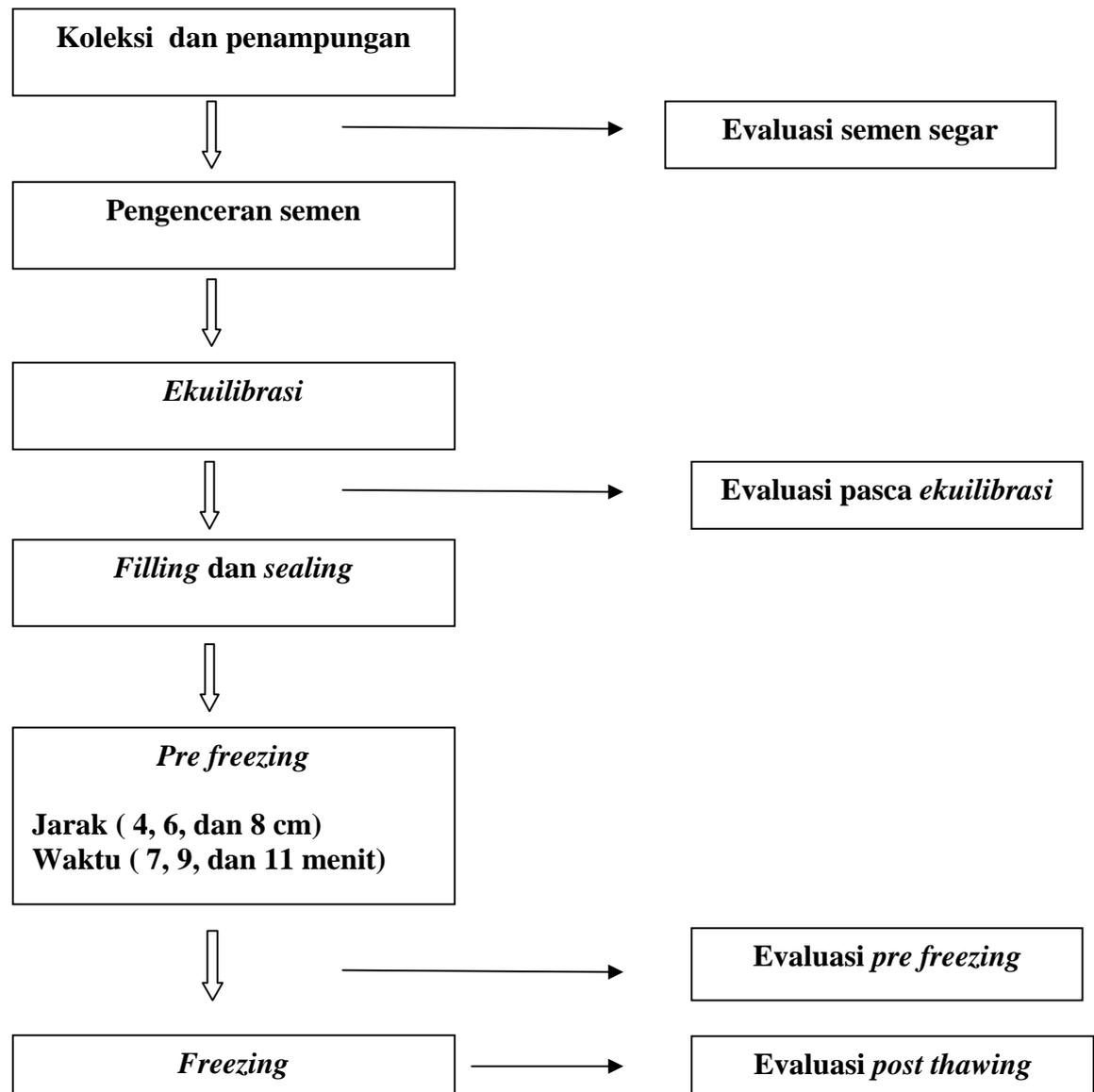
### **C. Rancangan Percobaan**

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan Rancangan acak lengkap (RAL) faktorial 3x3 dengan dua faktor perlakuan. Faktor pertama adalah lama waktu *pre freezing* yang terdiri dari 3 taraf perlakuan (7 menit, 9 menit, dan 11 menit). Faktor kedua adalah jarak straw dengan nitrogen cair yang terdiri dari 3 taraf perlakuan (4 cm, 6 cm, dan 8 cm).

### **D. Prosedur penelitian**

Kegiatan penelitian ini terbagi dalam beberapa tahap kegiatan yaitu proses koleksi atau penampungan semen, evaluasi semen segar, proses pengenceran, *ekuilibrase*, pemeriksaan *before freezing*, *filling* dan *sealing*, *pre freezing* (diikuti evaluasi semen), *freezing* (evaluasi semen *post thawing*), dan penyimpanan semen beku.

Prosedur kerja penelitian dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Prosedur kerja penelitian

### 1. Koleksi dan penampungan semen

Proses koleksi semen diawali dengan persiapan alat koleksi semen berupa vagina buatan serta persiapan pejantan pemancing. Pejantan pemancing yang digunakan harus diikat di dalam kandang jepit agar ketika digunakan

sebagai pemancing tidak akan lari dan mengurangi *stress* saat proses penampungan. Usaha untuk meningkatkan libido pejantan dengan melakukan *teasing* sebanyak 2--3 kali sebelum semen ditampung. Penampungan dilakukan menggunakan vagina buatan (*Artificial Vagina/ AV*). AV dibuat meyerupai vagina ternak betina sesungguhnya seperti temperatur dan kekenyalannya. Semen ditampung dalam tabung khusus kemudian segera setelah ditampung semen yang telah dikoleksi segera dibawa ke laboratorium untuk diperiksa dan diproses lebih lanjut.

## **2. Evaluasi semen segar**

Evaluasi semen segar dilakukan setelah semen ditampung. Evaluasi yang dilakukan meliputi pemeriksaan warna, bau, konsistensi (kekentalan) serta pemeriksaan motilitas dan gerakan massa spermatozoa menggunakan mikroskop dengan perbesaran 200 x. Dalam evaluasi semen segar ini juga dilakukan penghitungan konsentrasi spermatozoa yang bertujuan untuk menentukan jumlah pengencer yang akan digunakan dalam pengenceran semen.

## **3. Pengenceran semen**

Semen diencerkan dengan menggunakan bahan pengencer tris sitrat kuning telur. Bahan pengencer tris sitrat kuning telur terdiri dari kuning telur, asam sitrat, fruktosa, antibiotik (penisilin dan streptomisin), aquabides.

Proses pembuatan bahan pengencer tris sitrat kuning telur terdiri dari dua tahap yakni pembuatan larutan *stock solution* dan pengenceran. Pembuatan larutan *stock solution* dilakukan dengan cara menambahkan *tris aminomethan, citric acid*, fruktosa, aquabides dengan dosis yang telah ditentukan. Proses pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan larutan  $\pm 74\%$  *stock solution*,  $\pm 20\%$  kuning telur, gliserol (dengan dosis yang telah ditentukan), streptomisin dan penisilin. Setelah larutan tercampur, dilakukan pengadukan dengan tujuan untuk menghomogenkan bahan pengencer (BIB Poncowati, 2012). Volume bahan pengencer dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$\text{Jumlah pengencer (ml)} = \text{Volume semen} \times \% \text{ Motilitas} \times \text{Konsentrasi} 100 \text{ juta} / 0,25 (\text{dosis straw IB}) - \text{Volume}$$

#### **4. Ekuilibrasi**

Proses *ekuilibrasi* dilakukan setelah semen dicampur dengan bahan pengencer. *Ekuilibrasi* dilakukan selama 3--4 jam dengan suhu 4--5<sup>o</sup> C di dalam *cool top*. *Ekuilibrasi* merupakan waktu yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer agar pada saat pembekuan dapat mencegah kematian spermatozoa yang berlebihan.

#### **5. Pemeriksaan pasca ekuilbrasi**

Evaluasi dilakukan setelah semen melewati proses ekuilibrasi selama 4 jam. Evaluasi semen meliputi pengamatan motilitas massa dan motilitas

individu dari sampel tersebut. Cara evaluasi semen pada tahap pasca *ekuilibراسي* sebagai berikut

- a. mengambil semen dalam *cool top* setelah tahap *ekuilibراسي*  $\pm$  4 jam
- b. meneteskan satu tetes semen dalam gelas objek kemudian ditutup dengan *cover glass*
- c. mengamati semen pada mikroskop dengan perbesaran 200 x untuk melihat motilitas individu dan massa
- d. mencatat hasil evaluasi (BIB Poncowati, 2012)

#### **6. *Filling dan sealing***

Proses *filling sealing* merupakan proses pengisian dan pengemasan semen yang telah diencerkan karena telah memenuhi syarat setelah proses *ekuilibراسي*. Semen dikemas di dalam mesin *cool top* dengan suhu 5--6°C secara otomatis dan diisi ke dalam straw yang berisi 0,25 ml semen dengan konsentrasi sperma  $25 \times 10^6$  sel/dosis (BIB Poncowati, 2012).

#### **7. *Proses pre freezing***

Proses *pre freezing* semen dilakukan dengan cara meletakkan straw menggunakan boks diatas uap nitrogen selama 7, 9, dan 11 menit pada kisaran suhu mencapai  $-140^{\circ}\text{C}$ . Boks yang digunakan untuk proses *pre freezing* diisi dengan nitrogen cair dengan batas ketinggian 10 cm. Sedangkan, jarak permukaan nitrogen cair dalam boks dengan straw 4, 6, dan 8 cm. Proses *pre freezing* dilakukan dalam kondisi tertutup dengan tujuan untuk mengurangi proses penguapan nitrogen cair di dalam boks.

## 8. Evaluasi *pre freezing*

Evaluasi *pre freezing* merupakan pengujian kualitas semen untuk mengetahui motilitas massa dan motilitas individu serta daya tahan hidup sperma setelah proses *pre freezing*. Adapun cara pengujian pada tahap ini sebagai berikut:

- a. mengambil satu semen yang telah di *pre freezing*
- b. meneteskan satu tetes semen dalam gelas objek kemudian ditutup dengan *cover glass*
- c. mengamati semen pada mikroskop dengan perbesaran 200 x untuk melihat motilitas individu dan massa
- d. mencatat hasil evaluasi

## 9. Proses *freezing*

*Freezing* merupakan suatu proses semen mengalami pembekuan. Setelah dilakukan *pre freezing*, mini straw akan langsung dimasukkan ke dalam goblet dan kemudian dibekukan kedalam nitrogen cair dengan suhu  $\pm -196^{\circ}\text{C}$  selama 3--4 detik. Semen beku tersebut siap disimpan dalam kontainer dan dapat digunakan sesuai kebutuhan.

## 10. Evaluasi *post thawing*

Evaluasi semen beku setelah pencairan kembali (*post thawing*) merupakan pengujian kualitas terakhir dalam pengolahan semen beku.

Evaluasi pada tahap *post thawing* sebagai berikut:

- a. mengambil satu semen yang telah di *freezing*
- b. meneteskan satu tetes semen dalam gelas objek kemudian ditutup dengan *cover glass*
- c. mengamati semen pada mikroskop dengan perbesaran 200 x untuk melihat motilitas individu dan massa
- d. mengamati presentase hidup mati semen dengan metode pewarnaan diferensial menggunakan larutan eosin
- e. mencatat hasil evaluasi tersebut

## **E. Peubah Yang Diamati**

### **1. Motilitas spermatozoa**

Cara memeriksa motilitas spermatozoa pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. menempatkan satu tetes semen pada gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan ditempatkan di bawah mikroskop dengan pembesaran 200 x.
- b. Persentase motilitas dinilai secara kuantitatif dengan membandingkan spermatozoa hidup bergerak kedepan (progresif) dengan yang tidak progresif. Penilaian yang diberikan dari angka 0% (tidak bergerak) sampai 100% (gelombang sangat cepat dan spermatozoa bergerak sangat progresif ) (Feradis, 2010).

## 2. Persentase spermatozoa hidup

Cara memeriksa persentase spermatozoa hidup pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. meneteskan satu atau dua tetes eosin 2% pada ujung gelas obyek yang bersih;
- b. meneteskan semen segar dengan ukuran yang sama dengan zat pewarna pada ujung gelas obyek yang sama;
- c. menempelkan ujung gelas obyek yang lain atau ujung gelas penutup pada kedua cairan sehingga keduanya bercampur, kemudian didorong ke ujung gelas obyek;
- d. preparat ulas tersebut kemudian dikeringkan dengan cara menggerakkan di atas nyala lilin atau pemanas *buncen*;
- e. setelah kering, memeriksa spermatozoa yang hidup dan mati dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran sedang (10 X 40) atau kuat (10 X 100, bila perlu gunakan minyak emersi). Spermatozoa yang hidup tetap tidak berwarna, sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah atau merah muda. Jumlah spermatozoa yang dihitung minimal 210 sel;

$$\text{Spermatozoa hidup (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

(Mulyono, 1998).

## 4. Presentase abnormalitas

Cara memeriksa persentase abnormalitas pada penelitian ini sebagai berikut:

- a. meneteskan satu atau dua tetes eosin 2% pada ujung gelas obyek yang bersih;
- b. meneteskan semen segar dengan ukuran yang sama dengan zat pewarna pada ujung gelas obyek yang sama;

- c. menempelkan ujung gelas obyek yang lain atau ujung gelas penutup pada kedua cairan sehingga keduanya bercampur, kemudian didorong ke ujung gelas obyek;
- d. preparat ulas tersebut kemudian dikeringkan dengan cara menggerakkan di atas nyala lilin atau pemanas *buncen*;
- e. setelah kering, abnormalitas pada spermatozoa dengan melihat kecacatan pada spermatozoa, yaitu spermatozoa yang memiliki bentuk bentuk yang tidak normal. Terdapat dua macam kelompok bentuk abnormalitas pada spermatozoa, yaitu abnormalitas primer yaitu : Ukuran kepala lebih besar (macrocephalic) atau lebih kecil, (microcephalic) dari ukuran normal, kepala ganda atau ekor ganda, bentuk kepala tidak normal (penyok, benjol, pipih atau tidak beraturan), yang kedua adalah bentuk abnormalitas sekunder yaitu kepala pecah, ekor putus (pada bagian leher atau tengah-tengah) , ekor melipat, terpilin, atau tertekuk dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran sedang (10 X 40) atau kuat (10 X 100) bila perlu gunakan minyak emersi). Jumlah spermatozoa yang dihitung minimal 200 sel, perhitungan presentase abnormalitas dapat dilakukan dengan cara:

$$\text{Spermatozoa abnormal (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah total spermatozoa}} \times 100\%$$

(Salmah, 2014).

## **F. Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA ( *Analisis Of Varians* )

dengan tingkat kepercayaan 5 %.

## V. SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan

1. tidak terdapat interaksi antara lama waktu dan jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap persentase motilitas spermatozoa, persentase hidup spermatozoa dan persentase abnormalitas spermatozoa;
2. lama waktu *pre freezing* tidak berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi Bali;
3. jarak straw dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* tidak berpengaruh terhadap kualitas semen beku sapi Bali.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aini, K., S. Suharyati, dan M. Hartono. 2014. Pengaruh jarak *straw* dengan nitrogen cair pada proses *pre freezing* terhadap kualitas sperma beku Sapi Limousin. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 2 (3): 62--70
- Aminasari, P. D. 2009. Pengaruh Umur Pejantan Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. Universitas Brawijaya :Malang.  
<http://elibrary.ub.ac.id/bitstream/123456789/21674/1/Pengaruh-umur-pejantan-terhadap-kualitas-semen-beku-sapi-limousin.pdf> diakses 30 Agustus 2018
- Ax RL, N. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, dan M.E. Bellin .2000. Semen Evaluation. dalam: B Hafez & ESE Hafez. *Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincot Williams & Wilkins Philadelphia. USA
- Barth, A. D and R. J. Oko. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Iowa State University Press. Iowa
- BIB Poncowati. 2012. Standar Operating Procedure (SOP) Produksi Mani Beku. Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Lampung UPTD Balai Inseminasi Buatan. Lampung
- BIB Ungaran . 2011. Standar Operasional Pelayanan (SOP). BIB Sidomulyo Ungaran, Semarang
- Brezlaff, K. 1995. Goat Breeding and Infertility.p. 169-207. in. J. Meredith (eds). *Animal Breeding and Infertility*. Blackweel Science Ltd. Victoria, Australia
- Datta, U., M. C. Sekar, M. L. Hembram, dan R. Dasgupta. 2009. Development of a New Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10<sup>o</sup> C. *Proceedings. Departement of Veterinary Gynaecology & Obstetrics Faculty of Veterinary and Animal Sciences West Bengal University of Animal and Fishery Sciences. Kolkata West Bengal. India*
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butter worth. London

- Feradis, 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung
- Garner, D. L. and E. S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In Reproduction In Farm Animals. Edited by E. S. E. Hafez. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA
- Gillan L, W.M.C. Maxwell, dan G. Evans. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination, *Reprod Fertil Dev.* 16:447-454
- Graha, N. 2005. Recovery Rate dan Longivitas Pasca Thawing Semen Beku Sapi FH (Frisian Holstein) menggunakan berbagai Bahan Pengencer. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Hafez, E. S. E. 1987. Semen Evaluation. In: Reproduction In Farm Animals. E. S. E. Hafez (Ed). 5th Edition. Lea and Febinger. Philadelphia
- Hafez, E. S. E. 2000. Semen Evaluation. In: Reproduction In Farm Animals. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA
- Handiwirawan, E dan Subandriyo. 2004. Potensi dan keragaman sumberdaya genetik Sapi Bali. *Wartazoa* 14(3) : 50--60
- Hardijanto, Susilowati, Hernawati, Sardjito, dan Suprayogi. 2010. Buku Ajar Inseminasi Buatan. Airlangga University Press. Surabaya
- Hardjosubroto, W. 1994. Aplikasi Pemuliabiakan Ternak di Lapangan: PT. Gramedia Widiasarana. Jakarta
- Herdiawan, I. 2004. Pengaruh laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku Domba Priangan. *JITV* 9(2): 98-107
- Imran. 2012. Pengaruh Jarak Ketinggian Straw dengan Permukaan Nitrogen Cair dan Lama Waktu pada Tahap *Pre-freezing* Semen terhadap Motilitas Sperma Sapi Bangsa Limousine. Skripsi. Universitas Negeri Malang. Malang
- Kaiin, E. M., S. Said, F. Afianti dan M. Gunawan. 2004. Optimalisasi Pembekuan Semen Sapi PO: Perbaikan Teknik Pembekuan Sperma. Pros. Seminar Nasional Industri Peternakan Modern. Puslit Bioteknologi- LIPI. Makasar. 99—105
- Kristanto. 2004. Peranan Gliserol dan Fetal Bovine Serum dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Kualitas Semen Cair Domba Garut. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Lemma, A. 2011. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility, dalam: Milad Manafi. Editor. Artificial Insemination in Farm Animals. Croatia

- Maxwell, W. M. C. and P. F. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *J. Anim. Reprod. Sci.* 42: 55 – 65
- Morel D.M.C.G. 1999. *Equine Artificial Insemination*. Cabi Publishing. Wallingford. England
- Mulyono, S. 1998. *Teknik Pembibitan Kambing dan Domba*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Nilna. 2010. *Standar Operasional Pekerjaan Prosesing Semen*. Pengawas Mutu Bibit Ternak Dinas Peternakan Sumatra Barat. Padang
- Oka, I.G.L. 2010. Conservation and genetic improvement of Bali Cattle. *Proc. Conservation And Improvement of Wordl Indigenous Cattle*
- Parks, J.E. dan J.K. Graham. 1992. Effect of Cryopreservation procedures on sperm membrane. *Theriogenology* 38: 209–222
- Parrish, J. 2003. Techniques in domestic animal reproduction-evaluation and freezing of semen. [http://www.wisc.edu/ansci\\_repro/](http://www.wisc.edu/ansci_repro/)
- Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Mutiara. Jakarta
- Pratiwi, I.R, S. Suharyati, dan M. Hartono. 2014. Analisis kualitas semen beku Sapi Simmental menggunakan pengencer Andromed dengan variasi waktu *pre freezing*. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu*. 2 (3): 9--13
- Purwantara, B, R.R. Noor, G. Andersson, dan H. Rodriguez-Martinez. 2012. Banteng and Bali Cattle in Indonesia: Status and Forecasts. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 1), 2–6
- Putranti, O. D., Kustono dan Ismaya. 2010. Pengaruh penambahan crude tanin pada sperma cair Kambing Peranakan Etawa yang disimpan selama 14 hari terhadap viabilitas spermatozoa. *Buletin Peternakan*. 34:1--7
- Said, S., E.M. Kaiin, F. Afiati, M. Gunawan dan B. Tappa. 2004. Perbaikan Teknik Pembekuan Sperma: Pengaruh Ketinggian Straw dan Penggunaan Rak Dinamis. *Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. Puslitbang Peternakan. Bogor
- Salamon, S. 1971. Fertility of ram spermatozoa following pellet freezing on dry ice at -79°C and -140°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 183--185
- Salim, M.A., T. Susilawati, dan S. Wahyuningsih. 2012. Pengaruh metode *thawing* terhadap kualitas semen beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO. *Agripet*. 12: 14--19

- Salisbury, G.W dan N.L. Van Demark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Ternak Sapi. Terjemahan Djanuar. Universitas Gadjah Mada Press. Yogyakarta
- Salmah, N. 2014. Motilitas, Persentase Hidup dan Abnormalitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Bali pada Pengencer Andromed dan Tris Kuning Telur. Skripsi. Universitas Hassanudin. Makassar
- Situmorang, P. 2002. Pengaruh jenis dan aras krioprotektan terhadap daya hidup spermatozoa entog. JITV 7: 244 -- 250
- Solihati, N., R. Idi, S. R. Darojah, M. Rizal, dan M. Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa cauda epididimis Sapi Peranakan Ongole (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5°C. Animal Production. 1 (10) : 22--29
- Susilawati, T. 2000. Teknologi Preservasi dan Kriopreservasi Spermatozoa dan Ova. Tesis. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang
- Susilawati, T., P. Srianto, Hermanto dan E. Yuliani. 2003. Inseminasi Buatan Dengan Spermatozoa Beku Hasil Sexing pada Sapi untuk Mendapatkan Anak dengan Jenis Kelamin sesuai Harapan. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang
- Sugiarti, T., E. Triwulanningsih, P. Situmorang, R. G. Sianturi dan D. A. Kusumaningrum. 2004. Penggunaan Katalase dalam Produksi Semen Dingin Sapi. Puslitbang Peternakan. Bogor
- Suyadi, dan Susilawati. 1992. Pengantar Fisiologi Reproduksi. LUW Animal Husbandry Project Universitas Brawijaya. Malang
- Tambing, S.N, M.R. Toelihere, T.L. Yusuf, B. Purwantara, dan I.K. Utama. 2003. Kualitas semen beku kambing Saanen pada berbagai jenis pengencer. Hayati 10:146--150.
- Toelihere, M. R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung
- \_\_\_\_\_ 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung
- \_\_\_\_\_ 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa. Bandung
- Wahyuni, D. 2000. Sapi Bali diambang Kepunahan. Bisnis Indonesia. Jakarta
- Watson, J.A.L, dan A.F. O'Farrell. 1996. The Insects of Australia, a Text Book for Students and Research Workers volume I second edition. CSIRO. : Melbourne University Press. Australia

- Widiastuti, E. 2001. Kualitas Semen Beku Sapi FH dengan Penambahan Antioksidan Vitamin C dan E. Skripsi Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Widjaya, N. 2000. Pengaruh penambahan vitamin B1 (thiamine) dalam pengencer glukosa fosfat terhadap kualitas spermatozoa domba pada suhu 5°C. J. Ilmiah Ilmu-Ilmu Peternakan. 3(4): 15 – 22
- Wuragil. 2008. Pemeriksaan Kualitas Semen Sapi dan Domba dengan Menggunakan Beberapa Bahan Pengencer dengan Sistem Pool dan Pengaruh Metode Penyimpanan Straw Semen Cair Sapi Serta Pengaruh Suhu *Thawing* pada Semen Beku Sapi. Laporan Kegiatan PPDH, Insitut Pertanian Bogor. Bogor
- Yudhaningsih, H. 2004. Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Madura Menggunakan Motilitas dan Pengencer yang Berbeda Selama Proses Pembekuan Semen. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.