**PENGARUH BAHAN PENDINGIN DALAM TERMOS LAPANGAN TERHADAP MOTILITAS SPERMATOZOA SEMEN BEKU SAPI LIMOUSIN**

THE EFFECT OF COOLING MATERIAL IN FIELD TERMOS ON SPERMATOZOON MOTILITY OF LIMOUSIN BULL FROZEN SEMEN

**Ade Fajar Prasetiya, Setyo Utomo, dan Nur Rasminati**

Fakultas Agroindustri, Universitas Mercu Buana, Jl. Wates Km 10, Yogyakarta 55753

Email : [Faren.dena17@gmail.com](mailto:Faren.dena17@gmail.com)

**INTISARI\***

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rasio bahan pendingin (es dan garam dapur) dan lama penyimpanan terhadap motilitas semen beku sapi Limousin selama *thawing*. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 90 *straw* semen beku sapi Limousin. Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola searah dan diulang sebanyak 3 kali (straw). Faktor perlakuan yang dilakukan terdiri dari 5 taraf formulasi campuran es dan garam dapur, yaitu sebanyak 250 g es, P0 (0% garam), P1 (5% garam), P2 (10% garam), P3 (15% garam), dan P4 (20% garam). Variabel yang diamati yaitu suhu simpan dan motilitas spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *analysis of varians* (ANOVA), selanjutnya dilakukan uji lanjut DMRT.­ Hasil rata-rata motilitas spermatozoa dari perlakuan P0 (0% garam), P1 (5% garam), P2 (10% garam), P3 (15% garam), dan P4 (20% garam) selama 3 jam penyimpanan secara berurutan adalah 61,6%, 63,8%, 63,8%, 68,3%, dan 61,1%. Disimpulkan bahwa penggunaan garam dapur sebesar 15% adalah batas penggunaan garam dapur yang cocok sebagai bahan pendingin serta memberikan persentase motilitas tertinggi sampai penyimpanan 3 jam dengan nilai rata-rata sebesar 68,3%.

Kata kunci: es, garam dapur, semenbeku, motilitas, sapi Limousin

**ABSTRACT\***

This study aims to determine the effect of the ratio of coolant (ice and salt) and storage time on the motility of Limousin bull frozen semen during thawing. The material used in this study was 90 Limousin bull frozen semen straws. This study used a completely randomized experimental design (CRD) with a unidirectional and repeated 3 times (straw) pattern. The treatment factors consisted of 5 levels formulation of ice and salt, namely 250 g of ice, P0 (0% salt), P1 (5% salt), P2 (10% salt), P3 (15% salt), and P4 (20% salt). The variables observed were storage temperature and motility of spermatozoon. The data obtained were analyzed using analysis of variance (ANOVA), then further DMRT test was carried out. The results of the mean spermatozoon motility from treatment P0 (0% salt), P1 (5% salt), P2 (10% salt), P3 (15% salt), and P4 (20% salt) for 3 hours of storage were 61.6%, 63.8%, 63.8%, 68.3%, and 61.1%, respectively. It is concluded that the use of table salt of 15% is the limit for the use of table salt which is suitable as a cooling agent and provides the highest percentage of motility up to 3 hours of storage with an average value of 68.3%.

Keywords : ice, table salt, frozen semen, motility, Limousin bull

**PENDAHULUAN**

Daging sangat besar manfaatnya bagi pemenuhan gizi berupa protein hewani. Sapi sebagai salah satu hewan pemakan rumput sangat berperan sebagai pengumpul bahan bergizi rendah yang diubah menjadi bahan bergizi tinggi, kemudian diteruskan kepada manusia dalam bentuk daging. Mengkonsumsi protein hewani yang terdapat pada daging sangat berperan dalam menunjang kecerdasan anak, di samping diperlukan untuk daya tahan tubuh.

Sehubungan dengan kebutuhan protein ini, Sudarmono (2008) menjelaskan bahwa masyarakat Indonesia rata-rata memerlukan 50 g protein, 20% di antaranya berasal dari ternak dan ikan, yakni protein dari ternak 4 g/hari dan ikan 6 g/hari. Sedangkan 80% atau 40 g lainnya berupa protein nabati. Berdasarkan kebutuhan tersebut maka masyarakat Indonesia harus mengkonsumsi daging sebanyak 9,6 Kg/kapita/tahun, telur 3,4 Kg/kapita/tahun, dan susu sebanyak 4,6 Kg/kapita/tahun. Kenyataan di lapangan, menunjukan bahwa masyarakat Indonesia baru dapat memenuhi konsumsi protein hewani asal ternak rata-rata sebanyak 3,47 g/kapita/hari, sehingga konsumsi protein dari ternak ini masih sangat rendah. Jadi, untuk pemenuhan kebutuhan hewani dari daging ini, peternak perlu meningkatkan produksi daging. Salah satu cara untuk mewujudkan hal tersebut adalah dengan memanfaatkan teknologi IB (Inseminasi Buatan).

Inseminasi Buatan (IB) adalah proses perkawinan yang dilakukan dengan campur tangan manusia, yaitu mempertemukan sperma dan sel telur agar dapat terjadi proses pembuahan (fertilisasi). Teknologi IB dilakukan dengan maksud agar diperoleh efisiensi dan efektifitas dalam penggunaan pejantan terpilih, menghindari terjadinya penyebaran penyakit melalui sarana reproduksi, atau untuk mengatasi bila terjadi kendala dalam proses perkawinan alam antara jantan dan betina (Diwyanto, 2007).

Namun seringkali terjadi gagal kebuntingan disebabkan rendahnya kualitas semen beku *post thawing*. Motilitas spermatozoa setelah *thawing* atau *Post thawing motility* (PTM) adalah daya gerak spermatozoa setelah di thawing (Ali, dkk. 2019). Indikator rendahnya kualitas semen beku *post thawing* antara lain rendahnya motilitas massa ataupun individu, rendahnya angka viabilitas dan tingginya angka abnormalitas. Hal ini disebabkan salah satunya penanganansemen beku seperti *thawing*. *Thawing* dimaksudkan untuk mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Kondisi ini menimbulkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh rasio bahan pendingin (es dan garam dapur) dan lama penyimpanan terhadap motilitas semen beku sapi Limousin selama *thawing*.

**MATERI DAN METODE**

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 3-7 Agustus 2020, bertempat di Laboratorium Peternakan Universitas Mercu Buana Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola searah, dengan melakukan beberapa perlakuan campuran es dan garam dapur, yaitu P0 (0% garam), P1 (5% garam), P2 (10% garam), P3 (15% garam), dan P4 (20% garam). Penelitian ini menggunakan rasio antara es dan garam dapur sebanyak 250 g es, 0% garam dapur (tidak ada penambahan garam dapur), 5% garam dapur (sebanyak 12,5 g garam dari berat es), 10% garam dapur (sebanyak 25 g garam dari berat es), 15% garam dapur (sebanyak 37,5 g garam dari berat es), dan 20% garam dapur (sebanyak 50 g garam dari berat es). Penelitian akan diulang sebanyak 3 kali (straw).

Sebanyak 90 *ministraw* semen beku sapi Limousin didistribusikan dalam 5 buah termos berkapasitas 750 ml berbahan *stainles* yang sudah berisikan formulasi campuran es batu dengan 0% garam, es batu dengan 5% garam, es batu dengan 10% garam, es batu dengan 15% garam, dan es batu dengan 20% garam. *Starw* dimasukan ke dalam tabung *waterjaket* kemudian diletakan dalam termos secara berdiri. Setiap termos berisi 18 buah *straw* yang akan dilakukan pemeriksaan terhadap motilitas (%) setiap 30 menit sekali hingga pada jam ke 3 penyimpanan atau persentase motilitas spermatozoa mencapai 40% (layak IB).

Pemeriksaan motilitas pada *heating table* menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x10 kali dengan melihat obyek gerakan spermatozoa dibandingkan dengan spermatozoa yang tidak bergerak maupun bergerak tetapi tidak progresif maju ke depan. Perhitungan motilitas sperma pada penelitian ini diperiksa oleh lebih dari atu orang, karena perhitungan ini bersifat subjektif.

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *analysis of varians* (ANOVA) yang merupakan sebuah teknik analisis inferensial yang digunakan untuk menguji perbedaan rerata nilai, jika terdapat perbedaan dilakukan pengujian lebih lanjut yaitu uji DMRT (*Duncan New Multiple Range Test*).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Peningkatan Suhu Perlakuan**

Penelitian ini dilakukan untuk memanfaatkan campuran bahan pendingin es dan garam dapur agar dapat mempertahankan suhu dan durasi penyimpanan spermatozoa semen beku saat *thawing*, dengan menggunakan campuran garam dapur pada es dipercaya dapat mempertahankan titik beku dari es tersebut. Berikut adalah data perubahan suhu yang didapat pada saat penelitian:

Tabel 2. Data Perubahan Suhu (ºC)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **P (perlakuan)** | **Suhu Perlakuan (ºC)** | | | | | | |
| Suhu awal | 0,5 jam | 1 jam | 1,5 jam | 2 jam | 2,5 jam | 3 jam |
| **P0** | -6,7 | -4,3 | -2,7 | 0,5 | 4,7 | 5,1 | 5,4 |
| **P1** | -18,4 | -15,2 | -15,0 | -10,5 | -10,2 | -8,2 | -8,0 |
| **P2** | -17,6 | -17,7 | -18,0 | -17,9 | -16,5 | -16,2 | -15,8 |
| **P3** | -18,2 | -18,5 | -18,6 | -17,3 | -17,0 | -17,1 | -16,2 |
| **P4** | -16,9 | -17,1 | -17,1 | -5,2 | 0,1 | 4,3 | 9,1 |

Keterangan:

1. P0 : formulasi campuran es batu dengan 0% garam
2. P1 : formulasi campuran es batu dengan 5% garam
3. P2 : formulasi campuran es batu dengan 10% garam
4. P3 : formulasi campuran es batu dengan 15% garam
5. P4 : formulasi campuran es batu dengan 20% garam

Hasil yang ditunjukan dari perlakuan P0 (formulasi campuran es batu dengan 0% garam) menunjukkan peningkatan suhu yang tidak terlalu drastis, hal ini dikarenakan es disimpan di dalam termos lapangan yang terbuat dari *stainless steel*, sehingga suhu es dapat dipertahankan meski tanpa penambahan garam dan dapat mempertahankan wujud bekunya. Es batu pada umumnya akan mencair pada rentang waktu 10-20 menit pada suhu ruang diantara 28-30°C (Eka, 2019). Berbeda dengan perlakuan P1, P2 dan P3, pada perlakuan P4 (dengan formulasi campuran es batu dengan 20% garam) menunjukkan peningkatan suhu yang sangat drastis, pengukuran awal menunjukkan suhu es -16°C dan setelah 3 jam pengamatan suhu yang ditampilkan mencapai 9,1°C.

Perbedaan peningkatan suhu pada perlakuan P4 ini menunjukkan bahwa dengan menambahkan garam pada es batu melebihi 15% akan menyebabkan mencairnya es lebih cepat dari pada perlakuan P1, P2 dan P3. Penggunaan garam pada kehidupan sehari-hari salah satunya adalah untuk melelehkan salju di negara yang memiliki iklim dingin untuk membersihkan salju di jalan saat musim dingin.

Grafik 1. Grafik Peningkatan Suhu Es

Garam memiliki senyawa ionic yang terdiri dari ion positif (katio) dan ion negatif (anion), ketika garam dilarutkn ke dalam air, garam akan terurai menjadiion-ion komponen penyusunnya, yaitu Natrium dan Klorida. Komponen tersebutlah yang dapat memecah partikel es batu menjadi cair. Pada proses tersebut membutuhkan energi (energi atom) dan air mengandung energi thermal yang dapat membantu proses tersebut, sehingga dari proses ini garam mampu menurunkan suhu es menjadi lebih dingin.

Suatu pelarut jika dimasuki oleh zat terlarut lain akan terjadi perubahan suhu yang diperlukan untuk mencairkan atau membekukan larutan tersebut, dalam hal ini zat pelarut adalah air. Air murni tanpa zat terlarut apapun akan membeku pada 0°C dan mendidih pada suhu 100°C. Ketika es dicampur dengan garam, sebagian membentuk air garam dan es secara spontan terlarut dalam air garam, akibatnya air garam semakin banyak, di dalam segumpal es, air terstruktur membentuk tatanan geometrik yang tertentu dan kaku. Tatanan yang kaku ini rusak ketika diserang oleh garam, maka molekul-molekul air selanjutnya bebas bergerak ke mana-mana dalam wujud cair, tetapi merusak struktur padat molekul-molekul es memerlukan energi. Energi itu hanya dapat diperoleh dari kandungan panas dalam air garam. Gabriel Daniel Fahrenheit, pencipta skala temperatur Fahrenheit, menemukan bahwa garam yang dicampurkan ke es (pada temperatur sedikit di bawah titik beku) memungkinkan titik beku lebih rendah daripada ketika es hanya terdiri atas air. Dengan demikian, garam menyebabkan salju dan es meleleh (Supadi, 2012).

Berdasarkan penelitian ini, dapat diketahui bahwa formulasi campuran garam terhadap es yang sangat cocok dalam mempertahankan dan meningkatkan suhu es dalam jangka waktu yang lama membutuhkan persentase garam antara 10 hingga 15%, jika menggunakan lebih dari 15% campuran garam akan membuat es lebih cepat mencair dan tidak bisa mempertahankan suhu lebih lama.

**Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan**

Data yang didapatkan adalah data motilitas spermatozoa yang mendapatkan perlakuan penyimpanan dengan bahan pendingin yaitu campuran garam terhadap media es batu. Hasil dari data motilitas spermatozoa sapi Limousin yang didapat pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata motilitas spermatozoa sapi Limousin (%)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **P (Perlakuan)** | **Lama Pengamatan** | | | | | | **Rerata** |
| 0,5 jam | 1 jam | 1,5 jam | 2 jam | 2,5 jam | 3 jam |
| **P0** | 73,3 | 66,6 | 63,3 | 63,3 | 53,3 | 50 | 61,6a |
| **P1** | 76,6 | 70 | 63,3 | 63,3 | 56,6 | 53,3 | 63,8a |
| **P2** | 73,3 | 66,6 | 66,6 | 63,3 | 60 | 56,6 | 63,8a |
| **P3** | 83,3 | 73,3 | 66,6 | 63,3 | 63,3 | 60 | 68,3b |
| **P4** | 73,3 | 66,6 | 66,6 | 56,6 | 53,3 | 50 | 61,1a |
| **Rerata** | 76,6 | 69,3 | 65,3 | 62,0 | 57,3 | 53,3 |  |

Keterangan:

1. Rataan perlakuan yang diikuti oleh huruf superskrip yang sama berarti tidak berbeda nyata pengaruhnya terhadap respon yang diamati (P>0,05) menurut uji Duncan pada taraf nyata 5 persen.
2. P0 : formulasi campuran es batu dengan 0 persen garam
3. P1 : formulasi campuran es batu dengan 5 persen garam
4. P2 : formulasi campuran es batu dengan 10 persen garam
5. P3 : formulasi campuran es batu dengan 15 persen garam
6. P4 : formulasi campuran es batu dengan 20 persen garam

Hasil analisis variansi (*analysis of varians* (ANOVA)) dan uji lanjut menggunakan uji DMRT menunjukkan perlakuan P0, P1, P2 dan P4 tidak berbeda nyata, sedangkan perlakuan P3 sangat berbeda nyata (P<0,05) dari keempat perlakuan sebelumnya, sehingga dapat disimpulkan bahwa penggunaan garam dengan persentase 15 persen (P3) pada es batu berpengaruh secara nyata terhadap motilitas spermatozoa sapi Limousin setelah *thawing*. Perbedaan yang menunjukan nyata dan tidak nyata pada setiap perlakuan disebabkan oleh beberapa faktor yang dapat mempengaruhi motilitas spermatozoa.

Penggunaan garam dapur dan es pada penelitian ini dimaksudkan untuk menekan aktivitas metabolisme spermatozoa. Secara alami metabolisme spermatozoa akan menghasilkan radikal bebas, sehingga akan menyebabkan kematian. Peningkatam metabolisme spermatozoa dapat terjadi apa bila saat pengambilan *straw* langsung menggunakan tangan, selain itu saat pemeriksaan di bawah mikroskop spermatozoa terlalu lama terpapar oksigen. Menurut Datta dkk., (2009), spermatozoa yang terlalu lama terpapar oksigen menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas yang menghasilkan peroksidasi lipid, sebagai faktor penyebab kerusakan membran spermatozoa. Metabolisme semen menghasilkan salah satunya reaksi peroksidatif lipid jika bereaksi dengan radikal bebas (Zaniboni, dkk., 2006). Radikal bebas yang terdapat pada spermatozoa ditandai dengan meningkatnya Reactive Oxygen Species (ROS) (Sikka, 2004). Susilawati dkk. (2008) menjelaskan bahwa produksi ROS yang berlebihan tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan, sehingga antioksidan pada spermatozoa atau plasma seminalis dapat menyebabkan kerusakan asam lemak.

Kejadian peroksidasi lipid dapat menyebabkan rusaknya atau goyahnya hubungan membran plasma. Kerusakan membran plasma spermatozoa menyebabkan terhentinya proses metabolisme untuk menghasilkan energi karena keluar dan terbebasnya enzim-enzim yang diperlukan dalam metabolisme. Sehingga ATP yang diperlukan oleh spermatozoa untuk hidup dan motil menjadi rendah, selanjutnya menyebabkan kematian spermatozoa (Dasrul, 2012).

**Motilitas Sperma Selama Penyimpanan**

Rata-rata penurunan persentase motilitas selama pengamatan (0,5 jam hingga 3 jam penyimpanan) spermatozoa sapi Limousin dari setiap perlakuan tidak sama dan dapat diketahui bahwa dalam tabel 3 memperlihatkan persentase motilitas sperma di atas motilitas layak IB (40 persen) hingga jam ketiga penyimpanan di dalam termos yang terdapat bahan pendingin. Menurut Hafez (2000), persentase motilitas spermatozoa minimal 80 persen, *before freezing* minimal 60 persen, *post thawing motility* minimal 40 persen, *recovery rate* minimal 50 persen, dan *longivitas* minimal 10 persen untuk dapat di-inseminasikan. Pendapat tersebut diperkuat lagi oleh pendapat Zenichiro, dkk. (2002), bahwa persentase spermatozoa motil setelah *thawing* minimal 40 persen. Rata-rata motilitas yang paling tinggi terdapat pada perlakuan P3 (persentase garam 15 persen dari es) yaitu sebesar 68,3 persen. Berikut ini adalah grafik yang menunjukkan bahwa selama penyimpanan terdapat penurunan motilitas spermatozoa:

Grafik 2. Rata-rata motilitas spermatozoa selama penyimpanan

Grafik di atas menunjukkan penurunan motilitas spermatozoa sapi Limousin selama 3 jam penyimpanan. Hasil rata-rata perlakuan P0, P1, P2, P3, dan P4 secara berurutan adalah 61,6%, 63,8%, 63,8%, 68,3%, dan 61,1%. SNI (2017) memberikan persyaratan terhadap semen beku yang sudah dicairkan (*post thawing*) harus menunjukkan motilitas spermatozoa minimum 40%. Hal tersebut disebabkan oleh lambatnya aktivitas metabolisme spermatozoa yang membuat produksi asam laktat tidak meningkat dan tidak menyebabkan penurunan daya gerak spermatozoa. Hal ini dikarenakan suhu penyimpanan yang dingin, sehingga menyebabkan sel spermatozoa mengalami penghentian hampir seluruh aktivitas metabolisme sel. Didukung oleh pendapat Nurlia (2016), selama proses pembekuan sel spermatozoa akan mengalami penghentian hampir seluruh aktivitas metabolisme sel karena pengaruh suhu lingkungan yang menjadi dingin. Pada proses penyimpanan tersebut reaksi metabolisme akan terjadi secara *anaerob* tetapi energi yang dihasilkan akan menjaga daya tahan sel spermatozoa.

Selama penyimpanan *straw* pada termos lapangan yang berisikan bahan pendingin akan terjadi proses *thawing*, proses *thawing* terjadi apabila semen beku yang disimpan pada suhu -196°C dipindahkan atau disimpan pada suhu yang lebih tinggi, karena dapat meningkatkan metabolisme secara cepat, maka dapat diberikan kesimpulan bahwa terdapat hubungan antara suhu simpan dan motilitas spermatozoa. Semen beku sapi Limousin yang diberikan perlakuan es dan/atau di berikan campuran garam menunjukkan hasil yang dapat mempertahankan metabolisme spermatozoa.

Penelitian ini menunjukkan rata-rata motilitas spermatozoa yang paling tinggi terdapat pada perlakuan P3 (persentase garam 15% dari es) yaitu sebesar 68,3%, hal ini disebabkan oleh peningkatan suhu yang tidak ekstrim dan bertahan secara konstan, tetapi dalam penggunaannya hanya disarankan persentase garam 10-15% dari es, jika melebihi 15% maka akan mengalami peningkatan suhu yang drastis karena es lebih cepat mencair, yang nantinya dapat menyebabkan peningkatan aktifitas metabolisme spermatozoa.

**KESIMPULAN DAN SARAN**

**Kesimpulan**

Disimpulkan bahwa penggunaan formulasi garam sebesar 15% memberikan persentase motilitas tertinggi sampai penyimpanan 3 jam dengan nilai rata-rata sebesar 68,3%.

**Saran**

Distribusi semen beku dari kontiner depo ke lapangan atau menuju lokasi Inseminasi dapat menggunakan formulasi campuran garam 15% dari berat es batu ke dalam termos lapangan atau termos khusus.

**DAFTAR PUSTAKA**

Ali, M., N. Isnaini, A. Puspita A. Y., Kuswati, dan T. Susilawati. 2019. *Kualitas Spermatozoa Post Thawing Semen Beku Sperma Y Hasil Sexing Pada Sapi Limousin*. TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production Vol 20, No 1 (1-7).

Dasrul, Rasmaidar, dan Abdul H. 2012. Efektivitas Penambahan Vitamin E (alfa-Tokoferol) dalam Medium Pencucian Sperma dengan Sentrifugasi terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Brahman. *Agripet* Vol 12, No. 2

Datta, U., M. C. Sekar, M. L. Hembram, and R. Dasgupta. 2009. *Development of a New Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10ºC*. Procedings. Departement of Veterinary Gynaecology & Obstetrics Faculty of Veterinary and Animal Sciences West Bengal University of Animal and Fishery Sciences. Kolkata West Bengal. India.

Dwiyanto, K. 2007. *Aplikasi Sexing Semen Beku*. Komisi Bioetika Nasional. Singosari. [http://www.vet-indo.com/artikel-member/Meningkatkan- Efisiensi-Reproduksi-melalui-penggunaan-spermatozoa-sexing.html](http://www.vet-indo.com/artikel-member/Meningkatkan-%20Efisiensi-Reproduksi-melalui-penggunaan-spermatozoa-sexing.html). Diakses pada tanggal 20 Juni 2020.

Eka, D. S. 2019. *kok es dalam ruangan masih mencair*. Blooger. <https://wawasan85.blogspot.com/2019/07/kok-es-dalam-ruangan-masihmencair.html>

Hafez, E. S. E. 2000a. *X and Y chromosome bearing spermatozoa*. In Reproduction in farm animal. Lea and Febiger . Philadelphia.

. 2000b. *Preservation and cryopreservation of gametes and embryos*. In: Reproduction in Farm Animals. 7th ed. E. S. E. Hafez and B. Hafez (eds). Lippincot Williams & Wilkins, Philadelphia.

Nurlia, L. 2016. *Pengaruh Penambahan Dosis Rafinosa Dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Motilitas, Persentase Hidup Dan Abnormalitas Spermatozoa Sapi Ongole* [Skripsi]. Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Sikka, S. C. 2004. *Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology*. J. Androl. 25(1):5-18.

SNI 4869-1:2017. 2017. *Semen Beku-Bagian 1: Sapi*. Badan Standarisasi Nasional. Jakarta.

Sudarmono, A.S., Sugeng, dan Bambang. 2008. *Sapi Potong*. Penebar Swadaya: Jakarta.

Supadi. 2012. *Pengaruh Penambahan Garam Pada Es*. Blogspot. link <http://wwwsupadi.blogspot.com/2012/06/pengaruh-penambahan-garam-pada-es.html>

Susilawati, T., S. B. Sumitro, S. Hardjoprantoro, M. S. Djati, dan G. Ciptadi. 2008. Kaji banding antara pengencer tris dengan TCM-199 dalam upaya pembekuan semen sapi hasil penyaringan Sephandex G-200. *Media Veteriner*. 6 (4): 9-13.

Zaniboni, L., R. Rizzi, and S. Cerolini. 2006. Combined Effect of DHA DQGL-Tocopherol Enrichment on Sperm Quality and Fertility in the Turkey. *Theriogenology*. 65 (1): 1813-1827.

Zenichiro, K, Herliantien, Sarastina. 2002. *Instruksi Praktek Teknologi Prossesing Semen Beku Pada Sapi*. BBIB Singosari. Malang.