

PENGARUH MASA SIMPAN DALAM NITROGEN CAIR TERHADAP KUALITAS SPERMA BEKU SAPI PERANAKAN ONGOLE

Anis Khoirunnisa^{1*}, Setyo Utomo² dan Ajat Sudrajat²

^{1*}Diploma Kesehatan Hewan, Sekolah Vokasi IPB University
Jl. Pajajaran/Komp. Peternakan No.6, Babakan, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor,
Jawa Barat 16128

²Prodi Peternakan, Fakultas Agroindustri, Universitas Mercu Buana Yogyakarta
Jl. Wates Km 10, Yogyakarta 55753, Indonesia.

e-mail: ajat@mercubuana-yogya.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas sperma selama pembekuan dengan umur simpan yang berbeda dalam Nitrogen Cair (N₂). Penelitian dilakukan di Balai Besar Inseminasi Buatan Lembang, Bandung Barat, Provinsi Jawa Barat. Penelitian dilaksanakan selama 1 minggu dimulai dari tanggal 14 Februari 2024 sampai 20 Februari 2024. Penelitian menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola searah menggunakan 5 perlakuan dan 3 ulangan. Perlakuan meliputi P0 (masa simpan 1 hari), P1 (masa simpan 1 bulan), P2 (masa simpan 6 bulan), P3 (masa simpan 1 tahun), P4 (masa simpan 1,5 tahun) dengan 3 kali ulangan. Variabel yang diamati meliputi motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *analysis of varian* (ANOVA) dan apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Hasil penelitian pada P0, P1, P2, P3, dan P4 secara berturut-turut untuk Motilitas yaitu 40,00%, 41,67%, 40,00%, 41,67% dan 41,67%. Viabilitas secara berturut-turut yaitu 73,33%, 71,16%, 55,67%, 58,67% dan 50,67%, Abnormalitas secara berturut-turut yaitu 4,83%, 6,16%, 5,50%, 7,16%, 5,50%. Hasil analisis variansi motilitas dan abnormalitas menunjukkan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$), tetapi viabilitas menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa masa simpan sperma beku sapi peranakan ongole dalam nitrogen cair (N₂) yang disimpan selama 1,5 tahun memiliki kualitas baik dan layak untuk Inseminasi Buatan (IB).

Kata kunci: *Sapi Peranakan Ongole, Sperma, Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas*

EFFECT OF SHELF LIFE IN LIQUID NITROGEN ON FROZEN SPERM QUALITY OF ONGOLE CROSSBREED COW

ABSTRACT

This study aims to determine the quality of sperm during freezing with different shelf lives in Liquid Nitrogen (N₂). The research was conducted at the Lembang Artificial Insemination Center, West Bandung, West Java Province. Research carried out for 1 week starting from February 14, 2024 to February 20, 2024. The study used an experimental method with a unidirectional pattern of Complete Random Design (RAL) using 5 treatments and 3 replicates. The treatment included P0 (1-day shelf life), P1 (1-month shelf life), P2 (6-month shelf life), P3 (1-year shelf life), P4 (1.5-year shelf life) with 3 repetitions. The variables observed included motility, viability and spermatozoa abnormalities. The data obtained were analyzed using analysis of variants (ANOVA) and if there was a significant difference between the treatments, it was followed by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). The results of the study on P0, P1, P2, P3, and P4

respectively for Motility were 40.00%, 41.67%, 40.00%, 41.67% and 41.67%. Viability was 73.33%, 71.16%, 55.67%, 58.67% and 50.67% respectively, Abnormalities were 4.83%, 6.16%, 5.50%, 7.16%, 5.50%. The results of the analysis of variance of motility and abnormality showed no real difference ($P>0.05$), but viability showed a real difference ($P<0.05$). It can be concluded that the shelf life of frozen sperm of ongole breeding cows in liquid nitrogen (N₂) stored for 1.5 years is of good quality and suitable for Artificial Insemination (IB).

Keywords: *Ongole crossbreed Cows, Sperm, Motility, Viability, Abnormality.*

PENDAHULUAN

Kementerian Pertanian RI memperkirakan kebutuhan daging sapi di Indonesia akan meningkat dari 522.502 ton pada tahun 2019 menjadi sekitar 715.620 ton pada tahun 2023. Kenaikan ini disebabkan oleh pertumbuhan ekonomi dan tingkat konsumsi daging sapi per orang. Namun, produksi daging sapi di Indonesia hanya mencapai 534,7 ribu ton pada tahun 2019, sehingga negara harus mengimpor daging sapi untuk memenuhi kebutuhan. Salah satu solusi untuk mengatasi permintaan yang tinggi adalah dengan memperkuat sapi lokal. Namun, saat ini jumlah sapi lokal yang terbatas tidak dapat memenuhi permintaan yang terus meningkat. Faktor ini dipengaruhi oleh ketersediaan pakan ternak yang terbatas, sehingga sulit memenuhi kebutuhan daging dalam negeri.

Salah satu upaya untuk meningkatkan populasi sapi dan kualitas genetiknya adalah dengan menggunakan teknologi inseminasi buatan (IB). Sapi Peranakan Ongole (PO) adalah salah satu jenis sapi lokal yang bisa dimanfaatkan. Sapi PO memiliki sifat adaptasi yang baik terhadap iklim tropis dan keberagaman makanan, serta tahan terhadap gangguan panas dan parasit. Inseminasi buatan adalah teknik yang efektif untuk meningkatkan populasi sapi secara bertahap. Teknik ini memungkinkan penggunaan pejantan berkualitas tinggi untuk memperbaiki genetik ternak, mengurangi biaya, dan mencegah penyebaran penyakit. Namun, kualitas sperma yang digunakan dalam inseminasi buatan sangat mempengaruhi keberhasilan program ini. Sperma beku adalah metode.

yang digunakan untuk menyimpan dan mengawetkan sperma. Meski memiliki keunggulan karena dapat digunakan dalam jangka waktu yang lama, pembekuan sperma dapat menurunkan kualitasnya.

Pembekuan sperma mempengaruhi viabilitas dan kelangsungan hidup sperma. Proses ini juga dapat menyebabkan kerusakan pada sperma, terutama jika suhu yang digunakan terlalu rendah. Pembekuan juga memiliki risiko stres oksidatif dan pembentukan senyawa beracun yang dapat merusak sperma. Penggunaan semen beku di masa depan memungkinkan, tetapi perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh lama

penyimpanan dan kondisi pembekuan terhadap kualitas sperma. Penelitian ini penting untuk memastikan bahwa sperma yang digunakan dalam inseminasi buatan tetap memiliki kualitas yang baik selama penyimpanan dalam nitrogen cair. Dengan demikian, perlu adanya penelitian untuk mengevaluasi pengaruh lama penyimpanan sperma beku dalam nitrogen cair terhadap kualitas sperma, termasuk kualitas sperma setelah penyimpanan hingga 1,5 tahun.

MATERI DAN METODE

Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Balai Inseminasi Buatan Lembang yang terletak di Jl. Kiwi Ayu Ambon No. 78 Kayuambon, Kecamatan Lembang, Kabupaten Bandung Barat, Provinsi Jawa Barat. Waktu pelaksanaan penelitian pada 14 Februari 2024 sampai 20 Februari 2024

Materi Penelitian Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian antara lain straw beku semen Peranakan Ongole dengan umur penyimpanan yang berbeda-beda sebanyak 45 buah dengan 5 masa simpan yang berbeda di nitrogen cair yaitu 1 hari, 1 bulan, 6 bulan, 1 tahun dan 1,5 tahun, Air dengan suhu 37°C, NaCl Fisiologis dan larutan eosin.

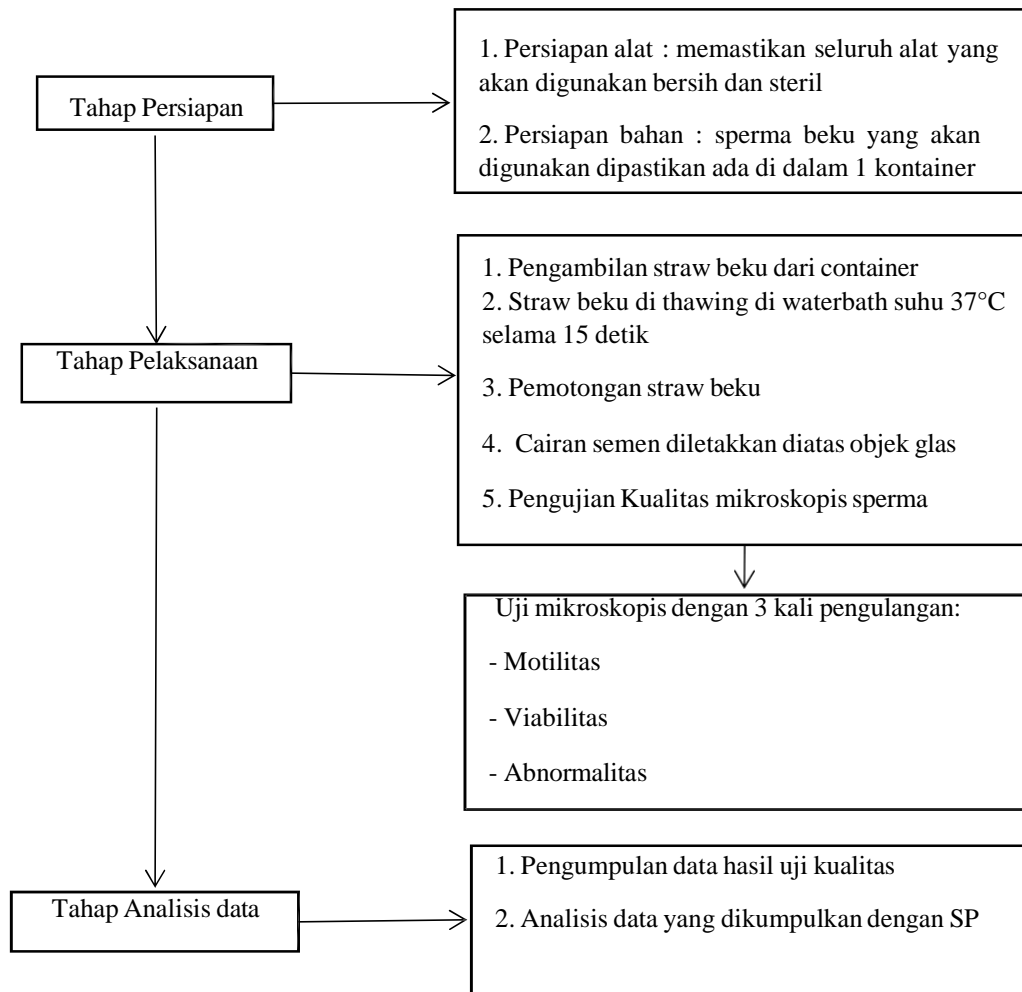
Mesin dan Peralatan

Alat yang akan digunakan dalam penelitian antara lain container, deck glass, corong mikropipet, preparat glass, objek glass, rak straw, lemari pendingin, waterbath, tabung sperma, mikroskop dan Homocytometer.

Metode Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan pada penelitian meliputi tahap persiapan, tahap pelaksanaan, tahap pengambilan data dan analisis data. Tahap persiapan yaitu persiapan alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian. Tahap pelaksanaan yaitu meliputi pengambilan straw semen beku sapi Peranakan Ongole yang telah disimpan di nitrogen cair di Balai Besar Inseminasi Buatan Lembang dengan lama umur simpan 1 hari, 1 bulan, 6 bulan, 1 tahun dan 1,5 tahun kemudian dithawing dan dilakukan pengujian kualitas spermatozoa menggunakan mikroskop. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan setiap masing-masing perlakuan atau setiap umur simpan. Tahap pengambilan data meliputi pengujian dengan variabel motilitas, viabilitas dan abnormalitas spermatozoa. Tahap analisis data yaitu setelah semua uji dilakukan dan didapatkan data kemudian

dilakukan analisis menggunakan SPSS. Metode penelitian dapat dilihat pada diagram alir di bawah ini:



Analisis Data

Teknik analisis data pada penelitian ini menggunakan model matematik Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rumus sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon(i)j$$

Keterangan:

Y_{ij} : nilai hasil pengamatan perlakuan ke i ulangan ke j dalam penelitian

μ : konstanta, rata-rata pengamatan dalam penelitian

α_i : pengaruh perlakuan ke i dalam penelitian

$\epsilon(i)j$: galat percobaan

i : perlakuan ke i,

i=1,2,3...

j : ulangan ke j,

j=1,2,3...

Data hasil pengamatan dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan, dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Masa Simpan Dalam Nitrogen Cair Terhadap Motilitas (%) Sperma Beku Sapi Peranakan Ongole

Motilitas sperma adalah jumlah sel sperma yang hidup dan bergerak maju atau progresif. Pergerakan sperma tergantung pada fungsi mitokondria. Kerusakan mitokondria berhubungan dengan perubahan suhu yang dapat menurunkan motilitas sperma (Sukmawati dkk., 2014). Penurunan kualitas semen dipengaruhi oleh lamanya masa penyimpanan, semakin lama waktu penyimpanan maka persentase motilitas spermatozoa akan semakin rendah (Lubis, 2011). Data Pengaruh Masa simpan dalam nitrogen cair (N₂) terhadap motilitas (%) sperma beku sapi peranakan Ongole tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh Masa simpan dalam nitrogen cair (N₂) terhadap motilitas (%) sperma beku sapi peranakan Ongol.

Perlakuan	Ulangan			Rerata ^{ns}
	1	2	3	
P0	40	40	40	40,00
P1	40	45	40	41,6
P2	30	50	40	40,00

P3	30	50	45	41,67
P4	40	45	40	41,67

Keterangan: * ns = non signifikan.

**P0=1 Hari, P1=1 Bulan, P2=6 Bulan, P3=1 Tahun dan P4=1,5 Tahun.

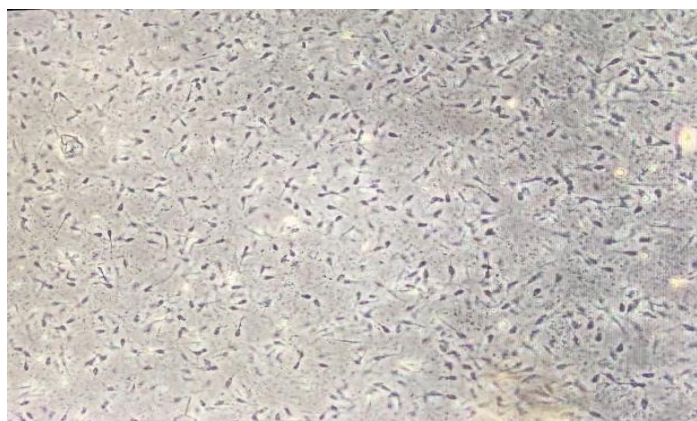
Berdasarkan hasil penelitian yang terlampir pada Tabel 1 dapat diketahui hasil analisis variansi menunjukkan bahwa perlakuan P0, P1, P2, P3, P4 tidak menunjukkan perbedaan secara nyata ($P>0,05$) terhadap kualitas sperma beku sapi Peranakan Ongole. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata masing-masing nilai motilitas pada masa simpan 1 hari (40,00%), masa simpan 1 bulan (41,67%), masa simpan 6 bulan (40,00%), masa simpan 1 tahun (41,67%) dan masa simpan

1,5 tahun (41,67%). Hal ini membuktikan bahwa lama masa simpan dalam Nitrogen cair (N₂) tetap dapat mempertahankan motilitas spermatozoa sesuai dengan standar. Suhu yang sangat rendah (-196°C) efektif menghentikan aktivitas metabolisme sperma, sehingga dapat mempertahankan kualitas yang baik dan disimpan dalam jangka waktu lama tanpa mengurangi kualitas sperma (Chakraborty dan Saha, 2022).

Semen yang disimpan dalam nitrogen cair pada suhu -196°C, menyebabkan metabolisme sperma dapat dikatakan berhenti, perkiraan laju metabolisme sebesar 0,02% dibandingkan dengan laju metabolisme sperma pada suhu fisiologis. Metabolisme akan meningkat dengan meningkatnya suhu (Rosadi dkk., 2015). Rataan nilai motilitas hasil penelitian dinyatakan layak digunakan untuk inseminasi buatan (IB) sesuai dengan pendapat Feradis (2010) bahwa motilitas spermatozoa setelah thawing minimal 40% jika kurang dari 40%

maka semen beku tersebut tidak layak diinseminasikan. Daya hidup spermatozoa selama pembekuan akan baik dengan tetap terjaganya membran plasma sehingga proses metabolisme didalam spermatozoa akan berjalan dengan baik (Rosadi dkk., 2015).

Keutuhan membran plasma dan tutup akrosom merupakan parameter kualitas sperma dan kesuburan yang baik (Almadaly dkk., 2014). Membran plasma sperma yang utuh atau terawat menjamin proses metabolisme sperma berlangsung dengan baik, sehingga berdampak positif terhadap motilitas sperma selama penyimpanan (Anwar dkk., 2015). Menurut Susilawati (2011), membran plasma sperma yang utuh sangat penting untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilan sel telur yang telah dibuahi, dan membran plasma yang utuh berkaitan dengan proporsi spermatozoa yang dapat hidup. Motilitas spermatozoa post thawing dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 1. Motilitas *Spermatozoa post thawing*

Pengaruh Masa Simpan Dalam Nitrogen Cair Terhadap Viabilitas (%) Sperma Beku Sapi Peranakan Ongole

Viabilitas sperma merupakan indikator pengujian sperma hidup dengan membran sel utuh. Viabilitas sperma biasanya diperiksa dengan memeriksa motilitas dan rasio hidup-mati. Kelangsungan hidup sperma mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap keberhasilan inseminasi buatan atau proses pembuahan pada saluran reproduksi betina (Sukmawati dkk., 2014). Menurut Hidayatin (2002), diperlukan spermatozoa dengan viabilitas minimal 50% yang layak digunakan pada inseminasi buatan. Data Pengaruh Masa simpan dalam nitrogen cair (N₂) terhadap viabilitas (%) sperma beku sapi peranakan Ongole tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh masa simpan dalam nitrogen cair (N₂) terhadap viabilitas (%) sperma beku sapi peranakan Ongole

Perlakuan	Ulangan			Rerata
	1	2	3	
P0	73	74	73	73,33 ^c
P1	67,5	75,5	70,5	71,16 ^c
P2	55	59	53	55,67 ^{ab}
P3	65,5	58	52,5	58,67 ^b
P4	50,5	52,5	49	50,67 ^a

Keterangan: *Rerata dengan superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

**P0=1 Hari, P1=1 Bulan, P2=6 Bulan, P3=1 Tahun dan P4=1,5 Tahun.

Berdasarkan hasil penelitian yang terlampir pada Tabel 2 dapat diketahui hasil analisis variansi menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa pada perlakuan P0, P1, P2, P3 dan P4 menunjukkan perbedaan secara nyata ($P < 0,05$). Hal ini dikarenakan kualitas spermatozoa selama penyimpanan mengalami penurunan yang disebabkan karena *cold shock*, perubahan pH dan berkurangnya nutrisi yang terkandung dalam bahan pengencer (Salisbury dkk., 1985). Penurunan kandungan nutrisi yang terkandung dalam bahan

pengencer dan semakin bertambahnya lama waktu penyimpanan menyebabkan persentase spermatozoa hidup yang dihasilkan juga menurun (Manehat., dkk 2021). Kerusakan membran plasma menyebabkan terganggunya proses metabolisme dan fisiologis sperma, sehingga mengakibatkan kematian sperma (Zhu dan Liu, 2000).

Persentase viabilitas spermatozoa segar (95%) jika dibandingkan dengan sperma beku maka persentase viabilitas spermatozoa setelah disimpan dan diencerkan kembali cenderung mengalami penurunan serta jika dibandingkan sperma segar, tingkat kelangsungan hidup sperma setelah thawing lebih rendah. Hal ini karena pembekuan pada suhu yang sangat rendah menyebabkan zat-zat penting didalam sperma bocor, mengurangi enzim intraseluler, lipoprotein, ATP, dan kalium intraseluler, merusak membran sel, dan mengurangi kelangsungan hidup. Menurut Lessard dkk. (2000) penurunan viabilitas masih tergolong normal, penurunan kualitas sperma setelah pembekuan cukup signifikan, dimana sekitar 50% sperma mati selama pembekuan, dan sperma yang bertahan hidup umumnya memiliki potensi reproduksi yang rendah.

Berdasarkan analisis lanjutan menggunakan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) menunjukkan bahwa perlakuan P0 dan P1 berbeda secara nyata terhadap perlakuan P2, P3 dan P4 ($P < 0,05$). Oleh karena itu, viabilitas optimal spermatozoa diketahui berada pada P0 (masa simpan 1 hari) dengan rata-rata viabilitas 73,33%. Terjadinya penurunan viabilitas pada perlakuan P2, P3 dan P4 dapat disebabkan karena penurunan jumlah Nitrogen cair (N₂) dalam container oleh karena itu volume Nitrogen cair harus selalu dikontrol secara berkala agar selalu menjaga kualitas dari sperma beku yang disimpan dalam jangka waktu yang lama (Akbar dkk., 2022)

Berdasarkan penelitian Ardhani dkk., (2020) melaporkan bahwa rata-rata kelangsungan hidup spermatozoa dari semen beku selama masa penyimpanan 1 sampai 10 tahun di balai inseminasi buatan adalah $55,33 \pm 2,60\%$. Sekitar 30% spermatozoa mati ketika pembekuan, dan spermatozoa yang bertahan hidup akan lebih sensitif terhadap lingkungan dan memiliki daya hidup yang pendek setelah pencairan (Situmorang dkk., 2000).

Pembekuan dan penyimpanan semen pada prinsipnya memberhentikan sementara aktivitas metabolisme sel tanpa mematikan fungsi sel, sehingga proses kehidupan akan berlanjut setelah pembekuan dihentikan atau dicairkan kembali (Putri dkk., 2015). Hal ini juga dikemukakan oleh Park dan Graham (1993) yang menyatakan bahwa kerusakan awal pada membran sperma terjadi pada proses pembekuan dan pencairan pada suhu antara -15 dan -60 °C, namun pada nitrogen cair tidak terjadi selama penyimpanan. Hasil

pengamatan menunjukkan hasil viabilitas semen selama pembekuan masih layak digunakan sesuai dengan Standar Nasional Indonesia (SNI) yaitu minimal viabilitas semen yang layak digunakan untuk inseminasi buatan adalah 50% (SNI, 2008). Viabilitas spermatozoa post thawing dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 2. Spermatozoa hidup ditunjukkan dengan kepala berwarna putih

Pengaruh Masa Simpan Dalam Nitrogen Cair Terhadap Abnormalitas (%) Sperma Beku Sapi Peranakan Ongole

Abnormalitas sperma diklasifikasikan menjadi abnormalitas primer, abnormalitas sekunder, dan abnormalitas tersier. Abnormalitas primer merupakan akibat kegagalan proses spermatogenik pada testis, sedangkan abnormalitas sekunder merupakan akibat kegagalan jalannya sperma menuju epididimis (Mahesa, 2016). Proses ejakulasi dan penanganan pasca ejakulasi dan pra IB dapat menyebabkan kerusakan pada sel sperma yang tergolong abnormalitas tersier (Hafez, 2000). Abnormalitas sperma tersier mempunyai ciri-ciri yang mirip dengan abnormalitas sekunder, seperti putus atau patahnya ekor atau kepala, namun abnormalitas tersier terjadi akibat proses persiapan saat observasi, termasuk persiapan preparat ulas (Salim dkk., 2012). Preparat ulas dapat menyebabkan terputusnya kepala atau ekor sperma, dan hal ini tergolong abnormalitas tersier (Yulnawati dkk., 2009). Pada sperma, *cold shock* dapat menimbulkan abnormalitas dimana ekor atau bagian tubuh melingkari kepala (Salisbury dan Van Demark, 1985). Data Pengaruh Masa simpan dalam nitrogen cair (N₂) terhadap abnormalitas (%) sperma beku sapi peranakan Ongole tersaji pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh masa simpan dalam nitrogen cair (N₂) terhadap abnormalitas (%) sperma beku sapi peranakan Ongole

Perlakuan	Ulangan			Rerata ^{ns}
	1	2	3	
P0	5	4,5	5	4,83

P1	5	8	5,5	6,16
P2	5	6,5	5	5,50
P3	7	8	6,5	7,16
P4	5	5,5	6	5,50

Keterangan: * ns = non signifikan.

**P0=1 Hari, P1=1 Bulan, P2=6 Bulan, P3=1 Tahun dan P4=1,5 Tahun.

Berdasarkan hasil penelitian yang terlampir pada Tabel 3 dapat diketahui hasil analisis variansi menunjukkan bahwa perlakuan P0, P1, P2, P3, P4 tidak menunjukkan perbedaan secara nyata ($P>0,05$) terhadap kualitas sperma beku sapi Peranakan Ongole. Hal ini dikarenakan rata-rata hasil nilai abnormalitas perlakuan P0, P1, P2, P3, P4 masih dibawah 20%. Kelainan bentuk sperma berdasarkan hasil penelitian lebih disebabkan oleh kelainan sekunder dan tersier yaitu putusnya ekor, terlihat ekor yang melengkung dan kepala putus. Spermatozoa yang abnormal tidak dapat membuahi sel telur, tanpa melihat apakah abnormalitas tersebut terjadi didalam tubuli seminiferi, dalam epididimis atau oleh perlakuan yang tidak sesuai terhadap ejakulat. Selama abnormalitas spermatozoa belum mencapai 20% dari sampel, maka semen tersebut masih dapat dipakai untuk inseminasi (Toelihere, 1993). Abnormalitas spermatozoa post thawing dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 3. Abnormalitas sperma ditunjukkan dengan kepala yang patah

Pembekuan adalah proses menghentikan sementara aktivitas vital sel (metabolisme sel) tanpa merusak fungsi sel, dan membiarkan aktivitas kehidupan tetap berjalan meskipun pembekuan telah berhenti, sehingga memperpanjang umur dan kegunaan sperma beku untuk jangka waktu yang lama selama penyimpanan setelah pembekuan. Oleh karena itu, pada prinsipnya faktor penurunan suhu digunakan untuk menjaga viabilitas sperma dan potensi pembuahan (Partodiharjo, 1992). Semen yang disimpan dalam nitrogen cair pada suhu -197°C , maka metabolisme sperma dapat

dikatakan berhenti, perkiraan laju metabolisme sebesar 0,02% dibandingkan dengan laju metabolisme sperma pada suhu fisiologis. Metabolisme akan meningkat dengan meningkatnya suhu (Rosadi dkk., 2015). Keunggulan sperma beku adalah dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama dengan pembuahan yang baik, tidak ada sperma beku yang terbuang meski sudah disimpan lama dan sperma beku bisa diangkut dalam jarak jauh pengiriman dan waktu pengiriman yang lama (Hardijanto dkk., 2010).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kualitas sperma beku masih layak digunakan (Motilitas >40%) untuk inseminasi buatan hingga umur simpan 1,5 tahun didalam nitrogen cair (N₂).

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, M., Malik, A., Fitriani, Dan Sakiman. 2022. Lama Penyimpanan Semen Beku Sapi Peranakan Ongole (PO) dalam N₂ Cair Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa. *Skripsi*. Universitas Islam Kalimantan
- Ardhani, F., H. Mufidah, R. Samsuriah, dan H. Pratama. 2020. Efek lama penyimpanan semen beku sapi Bali pada pos inseminasi buatan terhadap membran plasma, tudung akrosom utuh, dan DNA spermatozoa. *Jurnal Ilmu Peternakan Terapan*. 3(2):58-66. Universitas Mulwarman.
- Badan Standardisasi Nasional (BSN). 2015. SNI 7651.5:2015. Bibit Sapi Potong – Bagian 5: *Peranakan Ongole*. Jakarta.
- Badan Standardisasi Nasional. 2021. SNI Semen Beku- Bagian 1: *Sapi*. BSN, Jakarta
- Chakraborty, S. & S. Saha. 2022. Understanding sperm motility mechanisms and the implication of sperm surface molecules in promoting motility. *Middle East Fertil. Soc. J.* 27(4):1-12.
- 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 Animal* eds. 7th. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA.
- Garner, D. L., dan Hafez, E. S. E. 2016. Spermatozoa and Seminal Plasma. In B. Hafez & E. S. E. Hafez (Eds.). *Reproduction in Farm Animals*, (pp. 96–109).
- Hardijanto, S. Susilowati, T. Hernawati, T. Sardjito, TW. Suprayogi. 2010. *Buku Ajar Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hidayatin, D. 2002. *Kaji Banding Kualitas Semen Beku Produk BIB Lembang dan Singosari pada Setiap Jalur Distribusi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Khalil Wa, El-Harairy Ma, Zeidan Ab, Hassan Mae. 2018. Evaluation of Bull Spermatozoa During and After Cryopreservation: Structural and Ultrastructural Insights. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 6(Supp 1): S49-S56.
- Lessard, C., S. Parent, P. Leclerc, J.L. Bailey, and R. Sulliva. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of Andrologi*. 21:700-707.
- Lubis, T.M. 2011. Motilitas Spermatozoa Ayam Kampung dalam Pengencer Air Kelapa, NaCl Fisiologis dan Air Kelapa-NaCl Fisiologis pada 25-29 °C. *Jurnal Agripet*, 11(2):45-50
- Mahesa, R. 2016. Pengaruh lama thawing semen beku sapi Simental terhadap viabilitas dan morfologi abnormalitas spermatozoa. *Skripsi*. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto.
- Manehat, F.X., Agustinus A. Dethan., Paulus K, dan Tahuk. 2021. Motilitas, Viabilitas, Abnormalitas Spermatozoa dan pH Semen Sapi Bali Dalam Pengencer Sari Air Tebu-Kuningtelur Yang Disimpan Dalam Waktu Yang Berbeda. *Journal Of Tropical Animal Science And Technology*,3 (2):76-90.
- Park J.E. and J.K Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedur on sperm membranes. *Theriogenology*. 38: 209- - 222
- Partodiharjo, S. 1992. *Fisiologi Reproduksi Hewan*. Mutiara Sumber Widya. IPB. Bogor.
- Putri, R. D. A., M. Gunawan, dan E. M.Kaiin. 2015. Uji Kualitas Sperma Sexing Sapi Friesian Holstein (FH) Pasca Thawing. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*. 1 (8) : 2057-2061.
- Rosadi, B., Teguh S., dan Darmawan. 2015. Motilitas Spermatozoa Kerbau Lumpur pada Penyimpanan Semen Beku dalam Es. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*.18 (2): 98-101.
- 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(2):14-20
- Salisbury, G.W., dan Van Demark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi* (Terjemahan R. D januar). Gajah Mada Universitas Press, Yogyakarta
- Situmorang, P., E. Triwulanningsih, A. Lubis, T. Sugiarti, dan W. Caroline. 2000. Optimalisasi penggunaan chilling semen untuk meningkatkan persentase kebuntingan sapi perah. Laporan Penelitian Balai Penelitian Ternak. Ciawi.
- Sukmawati, E, R. I. Arifiantini dan B. Purwantara. 2014. Daya Tahan Spermatozoa terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi Pejantan Unggul. *JITV*, 19 (3): 168-175.
- Toelihere. 1993. *Ilmu Kebidanan pada Ternak Sapi dan Kerbau*. UI Press. Jakarta.
- Yulnawati, Herdis, H. Maheswari, A. Boediono, dan M. Rizal. 2009. Potensi Reproduksi dan Upaya Pengembangbiakan Kerbau Belang Tana Toraja. *Prosiding Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau*.
- Zhu, W.J., Liu, X.G., 2000. Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. *Asian J Andrology*, 2: 135-138.