

**PENGARUH LAMA EKUILIBRASI TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA
SAPI ACEH SETELAH PEMBEKUAN
MENGUNAKAN PENGENCER ANDROMED®**

*Effect of Equilibration Time on the Quality of Aceh Cattle Spermatozoa Frozen Using
Andromed® Diluents*

Muzakkir¹, Dasrul², Sri Wahyuni³, Muslim Akmal⁴ dan Mustafa Sabri³

¹Mahasiswa S2 Kesmavet Unsyiah Darussalam, Banda Aceh

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

³Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Histologi dan Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: dasrul.darni@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama ekuilibrasi terhadap kualitas semen sapi aceh setelah pembekuan dengan menggunakan pengencer andromed. Sampel semen dikoleksi dari 1 ekor sapi aceh jantan sehat berumur 3 -4 tahun menggunakan vagina buatan. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat kelompok perlakuan lama ekuilibrasi dengan enam kali ulangan. Koleksi semen dilakukan satu kali dalam seminggu selama enam minggu. Semen yang berkualitas baik selanjutnya diencerkan dengan media AndroMed® dengan perbandingan 1 : 4. Selanjutnya dimasukkan dalam straw dan diekuilibrasi selama 1 jam, 2 jam, 4 jam dan 6 jam pada suhu 5⁰C, selanjutnya diamati motilitas, persentase hidup dan membran plasma utuh. Kemudian dilakukan pembekuan di atas uap nitrogen cair selama 9 menit dan disimpan di dalam kontainer yang berisi nitrogen cair pada suhu -196 °C. Setelah penyimpanan selama 1 minggu, masing-masing semen beku dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. Data kualitas spermatozoa yang diperoleh dianalisis dengan analisis varian satu arah dan dilanjutkan dengan uji berganda Duncan. Hasil penelitian memperlihatkan lama waktu ekuilibrasi berpengaruh secara nyata (P<0,05) terhadap persentase motilitas, spermatozoa hidup dan MPU spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan. Rata-rata persentase motilitas, persentase hidup dan membran plasma utuh setelah ekuilibrasi selama 4 jam lebih tinggi secara nyata (P<0,05) dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam, namun tidak berbeda nyata (P>0,05) dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 6 jam. Simpulan lama ekuilibrasi berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan dengan menggunakan medium Andromed.

Kata kunci. Sapi aceh, Kualitas semen beku, lama ekuilibrasi, AndroMed®

ABSTRACT

This study was done to investigate effects of equilibration time on the quality of Aceh cattle semen frozen using Andromed® diluents. This experimental study used complete randomized design (CRD) with 4 equilibration times and 6 replications each. Semen samples were collected from healthy male Aceh cattle aged 3-4 years old using an artificial vagina once a week for 6 weeks. Good quality semen samples were diluted 1:4 in Andromed® diluents, inserted into straws and equilibrated at 5 °C for 1, 2, 4 and 6 hours. Post equilibrated semen quality was determined based on microscopic analysis on motility, viability and plasma membrane integrity. Semen was then frozen over liquid nitrogen vapor for 9 minutes and stored in a container containing liquid nitrogen -196 °C. After being frozen storage for 1 week, post thawed quality of semen from each treatment group were reevaluated. The data collected were analyzed using one way analysis of variance and Duncan multiple range tests. The results showed that average percentages of motility, viability and plasma membrane integrity of Aceh cattle spermatozoa equilibrated for 4 hours were significantly higher (P<0.05) than those equilibrated for 1 and 2 hours, but were not different (P>0.05) from those equilibrated for 6 hours. In conclusion, equilibration times significantly influenced quality of Aceh cattle spermatozoa frosted using Andromed® diluents.

Keywords: Aceh cattle, quality of semen, Equilibration time and AndroMed®

PENDAHULUAN

Dalam memenuhi kebutuhan daging sapi di Indonesia diperlukan pengembangan ternak sapi khususnya sapi potong lokal. Sapi aceh merupakan salah satu bangsa sapi potong lokal yang mempunyai karakteristik mampu beradaptasi dengan baik pada keterbatasan lingkungan seperti krisis pakan, air, penyakit parasit dan temperatur panas (Gunawan, 1998). Berdasarkan laporan Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Provinsi Aceh, populasi sapi aceh pada tahun 2015 tercatat 580.287 ekor, jauh menurun dibanding tahun 2010 yang mencapai 671.086 ekor dan tahun 2002 mencapai 711,143 ekor (Diskeswannak Aceh, 2016). Penurunan populasi ini diduga berkaitan dengan sistem pemeliharaan yang bersifat ekstensif tradisional, tingginya jumlah pematangan ternak produktif, terbatasnya pakan, menyempitnya areal penggembalaan dan kurang tersedianya sapi aceh pejantan unggul untuk mengawini sapi betina. Selain itu juga diakibatkan kebijakan pemerintah meningkatkan genetik sapi-sapi lokal melalui perkawinan silang dengan sapi pejantan unggul dan aplikasi inseminasi buatan (IB) menggunakan semen sapi unggul.

Salah satu teknologi reproduksi yang cukup efektif dan efisien untuk percepatan peningkatan populasi sapi aceh adalah aplikasi teknologi IB menggunakan semen beku sapi aceh unggul. Aplikasi IB disamping mampu meningkatkan populasi dan mutu genetik ternak, juga diharapkan akan dapat mempercepat penyebaran bibit ke wilayah produksi ternak terpencil. Namun aplikasi IB pada sapi aceh masih menemukan banyak kendala, terutama terbatasnya penyediaan semen beku sapi aceh dan belum ditemukannya metode pembekuan yang tepat untuk mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa setelah pembekuan.

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel spermatozoa tanpa

mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati et al., 2003). Sel spermatozoa yang tidak bergerak menurunkan kecepatan metabolisme sehingga menghemat penggunaan energi, dengan demikian proses hidup dapat berlanjut setelah pembekuan dihentikan. Masalah utama yang sering dihadapi dalam proses pembekuan semen adalah pengaruh *cold shock* terhadap sel spermatozoa yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air, yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es dan penumpukan elektrolit di dalam larutan atau di dalam sel. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa dan pada waktu *thawing*, permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel spermatozoa (Toelihere, 1993). Menurut Herdis (2008), semen akan mengalami penurunan kualitas sekitar 10 – 40% pada saat pembekuan. Kelemahan ini dapat diatasi dengan menggunakan zat-zat pelindung di dalam pengencer dan penurunan suhu secara gradual. Keefisienan zat pelindung selama proses pembekuan sangat dipengaruhi oleh waktu ekuilibrasi (Tambing, 1999; Afriantini *et al.*, 2007).

Waktu ekuilibrasi merupakan periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian spermatozoa yang berlebihan dapat dicegah (Toelihere, 1993). Semen harus berada dalam pengencer dengan atau tanpa gliserol selama kurang lebih 4 sampai 6 jam pada suhu 3-5°C sebelum dibekukan agar kerusakan mekanis pada spermatozoa dapat dihindari (Tambing, 1999). Jika waktu ekuilibrasi dilakukan dengan cepat maka air yang ada dalam sel akan keluar dalam jumlah sedikit sehingga belum mencapai tahap equilibrium, dan apabila dilakukan dengan lambat sel akan mempunyai

air dari dalam sel sehingga konsentrasi intrasel meningkat akibatnya sel tidak mengalami pembentukan es intraselular melainkan hanya terbentuk di luar sel (Mumu, 2009). Waktu ekuilibrasi pada proses pembekuan semen berbeda-beda pada berbagai jenis semen, individu pejantan, bahan pengencer dan metode pembekuan yang digunakan (Afriantini *et al.*, 2005; Komariah *et al.*, 2013; Hanafi *et al.*, 2016).

AndroMed[®] merupakan salah satu pengencer komersial yang tersusun dari beberapa bahan yang dibutuhkan oleh spermatozoa selama proses pembekuan, diantaranya fosfolipid, tris-(hidroksimetil)-aminometan, asam sitrat, fruktosa, gliserol, tilosin tartrat, gentamisin sulfat, spektinomisin, dan linkomisin (Minitub, 2001). Penggunaan AndroMed[®] sebagai pengencer sering dikombinasikan dengan larutan NaCl atau akuadestilata dengan perbandingan 1:4 (Herold *et al.*, 2006). Hasil penelitian yang dilakukan Hanafi *et al.* (2016), semen sapi Wagyu yang diencerkan dalam AndroMed[®] + Aquadest (1:4) dengan waktu ekuilibrasi 4 jam menghasilkan motilitas spermatozoa *post thawing* sebesar $35,51 \pm 7,71\%$ lebih baik dibandingkan dengan waktu ekuilibrasi 2 jam menghasilkan motilitas *post thawing* sebesar $30,09 \pm 4,12\%$. Sedangkan hasil penelitian Aku *et al.* (2007) penambahan 20 % AndroMed[®] dengan 3 % gliserol mampu mempertahankan kualitas spermatozoa domba setelah pembekuan. Namun sampai saat ini penggunaan AndroMed[®] dalam proses pembekuan semen sapi aceh belum pernah dilaporkan. Berdasarkan hal tersebut telah dilakukan suatu penelitian yang bertujuan mengetahui pengaruh lama waktu ekuilibrasi terhadap motilitas, spermatozoa hidup dan membran plasma utuh spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan menggunakan pengencer AndroMed[®].

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Balai Inseminasi Buatan Daerah (BIBD) Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Aceh yang berlokasi di Saree Kabupaten Aceh Besar selama 2 bulan. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental laboratorium dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat kelompok perlakuan lama ekuilibrasi (1 jam, 2 jam, 4 jam dan 6 jam) dengan lima kali pengulangan.

Hewan coba yang digunakan adalah satu ekor sapi aceh jantan sehat, berumur 4 tahun, dengan berat badan 350 kg yang dipelihara di BIBD Saree Aceh Besar. Sapi aceh pejantan tersebut sebelum ditampung semennya ditempatkan dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Sapi pejantan diberi pakan berupa konsentrat sebanyak 3,0 kg/ekor/hari, dan hijauan pakan ternak berupa campuran rumput alami dan rumput gajah dengan jumlah pemberian berkisar antara 20 – 25 kg segar/ekor/hari. Pemberian pakan konsentrat dilakukan pada waktu pagi hari, sedangkan hijauan pakan ternak diberikan pada waktu siang dan sore hari. Pemberian air minum secara *ad libitum*.

Penampungan semen dilakukan dengan menggunakan vagina buatan yang bertemperatur 42 – 45°C satu kali setiap minggu, dan setiap penampungan dilakukan sebanyak dua kali ejakulasi. Segera setelah penampungan, dilakukan evaluasi kualitas secara makroskopis (volume, warna, bau, pH dan konsistensi) dan mikroskopis (gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas, spermatozoa hidup, abnormalitas) sesuai standar baku balai inseminasi (BIB) Lembang. Semen segar yang memenuhi syarat kemudian diencerkan dengan pengencer AndroMed[®] secara merata dengan perbandingan 4:1. Semen yang sudah diencerkan kemas kedalam mini straw dengan menggunakan *filling* dan *sealing* otomatis. Kemudian semen yang sudah dikemas dalam mini straw dilakukan ekuilibrasi dalam cool tube

jam dan 6 jam (perlakuan). Selanjutnya dilakukan *free freezing* terhadap straw yang sudah diekuilibrasi tersebut dengan menempatkan pada uap nitrogen cair (2-3 cm di atas permukaan nitrogen cair) dalam box freezing (panjang 43 cm dan lebar 27 cm) dengan volume N₂ cair yang digunakan yaitu 7,5 liter selama 12-14 menit (hingga suhu mencapai -110 °C s/d -120 °C). Kemudian straw semen beku tersebut disimpan di dalam kontainer yang berisi nitrogen cair pada suhu -196 °C. Setelah penyimpanan selama 1 minggu, masing-masing sampel semen beku perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. *Thawing*

ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik. Parameter kualitas spermatozoa yang diamati meliputi persentase motilitas, spermatozoa hidup dan integritas membrane plasma utuh (MPU). Data persentase motilitas, spermatozoa hidup dan MPU spermatozoa yang diperoleh dianalisis dengan analisa varian dan dilanjutkan dengan Duncan (Steel dan Torrie, 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Sapi Aceh

Hasil penilaian kualitas semen segar sapi aceh setelah 5 kali penampungan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata (\pm SD) kualitas semen segar Sapi aceh setelah koleksi.

Parameter	Hasil Pengamatan
A. Makroskopis	
Volume (ml)	3,97 \pm 0,43
Warna	Krem keputih-putihan
Konsistensi	Sedang sampai Kental
pH	6,97 \pm 0,15
Bau	amis
B. Mikroskopis	
Gerak massa	+++
Motilitas (%)	81,25 \pm 2,50
Konsentrasi (10 ⁶ / ml)	1214,50 \pm 102,78
Spermatozoa hidup (%)	86,92 \pm 2,87
Abnormalitas (%)	6,42 \pm 1,33
Membran Plasma Utuh (%)	88,30 \pm 1,61

Rata-rata volume semen sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini adalah 3,97 \pm 0,43 ml/ejakulasi, dengan kisaran antara 3,50 – 4,50 ml. Rata-rata volume semen sapi aceh yang diperoleh pada penelitian lebih rendah dibandingkan pada sapi brahman umur 3,5 tahun yakni 4,72 \pm 1,82 ml (Kuswahyuni, 2009), pada sapi bali umur 5 tahun adalah 4,5 \pm 2,3 ml (Ratnawati *et al.*, 2008), pada sapi Limousin berumur 3 tahun adalah 5,2 \pm 1,2 ml (Aminasari (2009), dan sapi Simmental yang berumur 3,5 tahun yaitu 5,08 \pm 0,71 ml (Hasibuan, 2009). Namun relatif lebih tinggi dibandingkan dengan volume semen sapi PO umur 2 - 3 tahun

yaitu 2,6 \pm 1,5 ml (Affandhy, 2009). Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan spesies, umur dan berat badan sapi yang digunakan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Hafez (2004) bahwa sifat semen dipengaruhi oleh umur pejantan dan interaksi antara umur dengan interval penampungan. Umur juga mempunyai hubungan yang signifikan dengan musim sehingga dapat mempengaruhi volume ejakulat, konsentrasi dan persentase motilitas spermatozoa (Mathevon, *et al.*, 1998). Selain ini adanya perbedaan nilai rata-rata volume semen tersebut juga dipengaruhi oleh kondisi masing-masing

individu seperti kualitas reproduksi, kondisi ternak, metode koleksi dan sering tidaknya sapi tersebut dikoleksi semennya. Sebagaimana dikemukakan oleh Toelihere (1985), kualitas dan kuantitas semen segar dipengaruhi oleh umur, kualitas pakan, berat badan, kondisi dan bangsa ternak. Pada penelitian ini sapi-sapi pejantan yang ditampung semennya sedang dilatih sebagai pemacek untuk penampungan semen.

Warna semen merupakan cerminan dari kekentalan semen. Dalam kondisi normal dikatakan bahwa semakin pekat warna semen yang terlihat, maka semakin kental konsistensi semen tersebut. Demikian juga sebaliknya pada semen yang berwarna agak pucat akan didapatkan konsistensi semen yang encer (Toelihere, 1985). Secara umum warna semen segar sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini berkisar dari warna putih susu sampai krem atau kekuning-kuningan. Warna semen ini adalah normal sesuai dengan pendapat Bearden dan Fuquay (1984) yang menyebutkan bahwa warna semen sapi dari ejakulasi normal adalah putih susu dan 10% saja yang berwarna krem. Hasil ini serupa dengan yang dilaporkan Wijono (1999) bahwa warna semen segar sapi madura adalah krem keputihan atau putih susu dengan konsistensi rata-rata agak kental.

Konsistensi semen adalah derajat kekentalan semen dapat diperiksa dengan cara menggoyang tabung yang berisi semen. Semen yang baik, derajat kekentalannya hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu, sedangkan semen yang jelek, baik warna maupun kekentalannya sama dengan air buah kelapa (Hafez, 2004). Hasil pemeriksaan konsistensi semen segar sapi aceh yang digunakan pada penelitian berkisar antara sedang (agak encer) sampai kental (rata-rata agak kental).

Derajat keasaman (pH) semen sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin rendah atau semakin tinggi pH semen dari pH normal akan membuat

spermatozoa lebih cepat mati. Derajat keasaman (pH) semen bervariasi tergantung spesies ternak Toelihere (1985) menyatakan bahwa derajat keasaman atau pH sangat mempengaruhi daya hidup spermatozoa. Selanjutnya dikatakan bahwa spermatozoa yang konsentrasinya tinggi biasanya memiliki pH yang sedikit asam. Rata-rata pH semen sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini adalah $6,97 \pm 0,15$ berkisar antara 6,8 sampai 7,2. Hasil ini relatif sama dengan yang diperoleh pada semen sapi FH yaitu 6,5 – 7,0 (Arifiantini *et al.*, 2005), sapi PO sebesar 7,0 (Affandhy *et al.*, 2009) dan sapi Simental sebesar 6,8 – 7,2 (Aminarti, 2009). Secara umum pH semen sapi aceh pada penelitian ini masih dapat dikatakan normal karena Bearden dan Fuquay (1984) menyatakan bahwa rata-rata pH semen yang normal adalah 5,9-7,3.

Ciri utama spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai gerakan massa dan motilitas dengan daya gerak yang progresif. Gerakan massa spermatozoa merupakan cerminan dari motilitas atau gerakan individu spermatozoa. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa bergerak kedepan, maka gerakan massa akan semakin baik (semakin tebal dan pergerakannya semakin cepat). Rata-rata gerakan massa yang diperoleh dari semen segar sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini adalah berkisar antara (++) sampai (+++). Hal ini membuktikan semen sapi aceh pada penelitian ini berada dalam kondisi bagus.

Penilaian konsentrasi spermatozoa sangat penting karena faktor inilah yang menggambarkan sifat-sifat semen yang dipakai sebagai salah satu kriteria penentuan kualitas semen (Bearden dan Fuquay, 1984). Hasil pengamatan rata-rata konsentrasi spermatozoa sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini adalah sebesar $1214,50 \pm 102,78 \times 10^6$ sperma/ml, dengan kisaran antara 1070 – 1350 $\times 10^6$ sperma/ml. Rata-rata konsentrasi spermatozoa sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini relatif sama

dengan konsentrasi spermatozoa sapi Limousine sebesar $1153,64 \pm 127,50 \times 10^6/\text{ml}$ dan sapi Simmental sebesar $1129,75 \pm 180,99 \times 10^6$ sperma/ml (Sukmawati *et al.*, 2014). Namun lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi spermatozoa sapi Brahman sebesar $1475,34 \pm 203,23 \times 10^6$ sperma/ml (Kuswahyuni, 2009), sapi bali sebesar $1340,28 \pm 447,85 \times 10^6$ sperma/ml (Arifiantini *et al.*, 2006) dan sapi pesisir sebesar $1887,5 \pm 692,2 \times 10^6$ sperma/ml (Apriyanti, 2012). Perbedaan konsentrasi spermatozoa antar pejantan diduga disebabkan karena kualitas genetik pada masing-masing pejantan (Situmorang, 2002). Konsentrasi spermatozoa dipengaruhi oleh umur pejantan dan mempunyai kecenderungan untuk meningkat seiring dengan meningkatnya umur sampai 22 bulan (Mathevon *et al.*, 1998). Selain itu produksi spermatozoa tergantung pada jumlah jaringan aktif testis, yang sebaliknya tergantung pada besar badan (Hafez, 2007).

Motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa sesudah ejakulasi selalu digunakan sebagai pegangan yang termudah dalam penilaian kualitas semen untuk bisa diproses lebih lanjut. Motilitas atau daya gerak progresif ini mempunyai peranan yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Kecepatan gerakan spermatozoa untuk masing-masing spesies berbeda dan bervariasi sesuai dengan frekuensi ejakulat, kondisi medium dan suhu lingkungan (Toelihere, 1985). Rata-rata persentase motilitas spermatozoa semen segar sapi aceh yang diperoleh adalah $81,25 \pm 2,50$ % dengan kisaran 75,00 % sampai 85,00 %. Hasil ini lebih tinggi bila dibandingkan dengan penelitian Turyan (2005) yang melaporkan bahwa Sapi Limousin mempunyai rata-rata persentase motilitas spermatozoa adalah $76 \pm 0,05$ % dan yang dilaporkan Dewi *et al.*, (2012) yang menemukan persentase motilitas spermatozoa sapi bali di Indonesia adalah sebesar $74,50 \pm 3,69$ %. Perbedaan hasil ini kemungkinan disebabkan oleh

perbedaan spesies, umur, frekuensi penampungan, teknik penampungan, pakan dan manajemen pemeliharaan (Hafez, 2007).

Rata-rata persentase spermatozoa hidup semen segar sapi aceh pada penelitian ini adalah $86,92 \pm 2,87$ % dengan kisaran antara 82,00 % sampai 90,00 %. Hasil ini relatif sama dengan yang dilaporkan oleh Ratnawati *et al.*, (2008) dimana rata-rata persentase hidup spermatozoa sapi bali adalah $88,03 \pm 3,07$ %, namun lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan Sukmawati (2014) persentase spermatozoa hidup sapi Liemosin yakni 94,08%. Nilai persentase spermatozoa hidup lebih tinggi dari persentase motilitas, dikarenakan bahwa spermatozoa yang hidup tidak motil progresif, tetapi sebenarnya masih hidup sehingga tidak terpapar pada saat fiksasi.

Abnormalitas spermatozoa adalah merupakan kelainan fisik dari spermatozoa yang terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa dalam tubuli seminiferi maupun karena proses perjalanan spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan. Rata-rata persentase spermatozoa abnormal dari semen segar sapi aceh yang diperoleh pada penelitian ini adalah $6,42 \pm 1,33$ % berkisaran antara 4,50 % sampai 8,25 %. Persentase abnormalitas spermatozoa yang diperoleh pada penelitian ini relative lebih tinggi dibandingkan dengan sapi limousine yakni $4,33 \pm 1,2$ % (Aminasari, 2009), namun relatif sama dengan hasil ini relatif sama dengan yang dilaporkan Dewi *et al.* (2012) bahwa persentase spermatozoa abnormal sapi bali yang dipelihara di Indonesia adalah sebesar $6,56 \pm 3,05$ %.

Rata-rata persentase MPU spermatozoa semen segar sapi aceh pada penelitian ini adalah $88,30 \pm 1,61$ % dengan kisaran antara 83,50 % sampai 90,25 %. Hasil ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Apriyanti (2012) dimana rata-rata

persentase MPU spermatozoa sapi pesisir adalah 84.75 ± 3.28 %, namun lebih rendah dibandingkan dengan yang dilaporkan Ratnawati *et al.*(2008) persentase MPU spermatozoa sapi bali yakni 92,67%. Nilai persentase MPU spermatozoa berkorelasi positif dengan fertilitas pejantan, semakin tinggi persentase MPU spermatozoa maka semakin tinggi pula daya fertilitas, demikian pula sebaliknya. Berdasarkan hasil penilaian semen segar pada tabel 1 diatas, dapat disimpulkan bahwa semen segar sapi aceh yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kategori baik dan memenuhi syarat untuk digunakan sebagai sampel semen untuk dibekukan.

2. Pengaruh Lama Ekuilibrasi terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi aceh setelah Pembekuan dengan medium AndroMed[®]

Rata-rata kualitas spermatozoa sapi aceh pada penelitian ini diamati berdasarkan pada persentase motilitas spermatozoa, spermatozoa hidup dan membran plasma utuh spermatozoa pada setiap tahapan pembekuan mulai pengenceran, ekuilibrasi dan setelah pembekuan (*thawing*). Rata-rata kualitas spermatozoa sapi aceh pada berbagai perlakuan kuning telur angsa setelah pembekuan (*thawing*) dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata (\pm SD) kualitas spermatozoa sapi aceh pada berbagai lama ekuilibrasi setelah proses pembekuan dengan pengencer AndroMed[®]

Lama Ekuilibrasi	Kualitas Spermatozoa		
	Motilitas Spermatozoa	Spermatozoa hidup	Persentase MPU Spermatozoa
1 jam	27,68 \pm 4,53 ^a	33,89 \pm 4,26 ^a	32,97 \pm 5,18 ^a
2 jam	36,82 \pm 2,88 ^b	39,01 \pm 2,87 ^a	38,73 \pm 3,50 ^b
4 jam	45,53 \pm 2,75 ^c	50,61 \pm 3,96 ^b	48,11 \pm 5,93 ^c
6 jam	44,38 \pm 3,31 ^c	48,06 \pm 3,06 ^b	45,28 \pm 3,90 ^c

Ket : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$).

Persentase motilitas spermatozoa sapi aceh

Motilitas adalah daya gerak maju (progresif) individu spermatozoa sesudah proses pembekuan selalu digunakan sebagai pegangan yang termudah dalam penilaian kualitas semen untuk inseminasi. Kecepatan gerakan spermatozoa setelah pembekuan untuk masing-masing spesies berbeda dan bervariasi sesuai dengan lama ekuilibrasi, kondisi medium dan suhu lingkungan (Toelihere, 1985). Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi aceh pada berbagai lama ekuilibrasi setelah proses pembekuan dengan medium AndroMed[®] dapat dilihat pada tabel 2.

Rata-rata persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan tertinggi ditemukan pada kelompok perlakuan ekuilibrasi 4 jam, kemudian diikuti oleh kelompok

perlakuan 6 jam, 2 jam dan 1 jam. Hasil analisis varian satu arah terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi selama 4 jam lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam, namun tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan setelah ekuilibrasi selama 6 jam. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi selama 6 jam lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam. Sedangkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah ekuilibrasi selama 1 jam tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan setelah ekuilibrasi selama 2 jam. Hasil ini membuktikan bahwa lama ekuilibrasi berpengaruh secara nyata ($P < 0,05$)

spermatozoa sapi aceh. Ekuilibrasi selama 4 jam menghasilkan persentase motilitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam, namun tidak berbeda dengan ekuilibrasi selama 6 jam.

Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Herdis (1998) bahwa ekuilibrasi adalah waktu yang dibutuhkan spermatozoa untuk menyesuaikan diri dengan gliserol dalam medium pada waktu ekuilibrasi dalam *cool top* suhu 5 °C. Adanya gliserol dalam medium AndroMed[®] akan membantu spermatozoa bertahan terhadap penurunan suhu sehingga akan mengurangi kerusakan spermatozoa akibat *cold shock* selama proses pembekuan. Hafez (2004) menyatakan penambahan gliserol sebagai krioprotektan ke dalam bahan pengencer pada waktu ekuilibrasi membutuhkan waktu yang optimum. Ekuilibrasi yang terlalu lama akan menyebabkan kontak gliserol dengan spermatozoa yang berlebihan sehingga gliserol akan bersifat toksik terhadap sel spermatozoa (Umar dan Maharani, 2005). Selanjutnya dinyatakan oleh Best (2006) bahwa gliserol akan menarik air secara berlebihan dari dalam sel spermatozoa yang menyebabkan dehidrasi dan selanjutnya terjadi kerusakan sel spermatozoa. Pada waktu ekuilibrasi gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrasi yang lebih lama kemungkinan gliserol dapat bersifat toksik sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa dan menyebabkan gangguan motilitas maupun viabilitas dari spermatozoa (Toelihere, 1979). Rusaknya membran plasma spermatozoa akan meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion-ion, termasuk ion kalsium sehingga akan berakibat terhadap meningkatnya ion kalsium dalam sitosol yang diikuti dengan meningkatnya ion kalsium dalam

ion kalsium dalam mitokondria ini akan menurunkan sintesa ATP dalam mitokondria sehingga cadangan energi yang dapat digunakan untuk motilitas spermatozoa akan menurun (Hafez, 2004). Selain itu, penyimpanan dalam bentuk beku menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya penimbunan asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam. Lebih lanjut Ratnawati *et al.* (2008) menyatakan bahwa proses pendinginan (*cooling*), pembekuan (*freezing*) dan pencairan (*thawing*) sangat mempengaruhi stabilitas dan fungsi-fungsi hidup sel membran.

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan pada semua kelompok lama waktu ekuilibrasi lebih rendah dibandingkan dengan persentase motilitas spermatozoa pada semen segar. Terjadinya penurunan persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan disebabkan oleh karena spermatozoa yang telah mengalami cekaman dingin (suhu rendah) dapat mengalami destabilisasi membran. Destabilisasi membran akan meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion-ion, termasuk ion kalsium sehingga akan berakibat terhadap meningkatnya ion kalsium dalam sitosol yang diikuti dengan meningkatnya ion kalsium dalam mitokondria. Meningkatnya konsentrasi ion kalsium dalam mitokondria ini akan menurunkan sintesa ATP dalam mitokondria sehingga cadangan energi yang dapat digunakan untuk motilitas spermatozoa akan menurun (Simpson dan Russel, 1998). Selain itu, penurunan motilitas spermatozoa setelah proses pembekuan juga diakibatkan oleh semakin sedikitnya cadangan energi yang cukup untuk pergerakan spermatozoa, serta terbentuknya asam laktat sebagai sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam. Kondisi ini dapat bersifat racun bagi

kematian spermatozoa (Sugiarti dkk., 2004). Lebih lanjut Einarsson (1992) menyatakan bahwa proses pendinginan (*cooling*), pembekuan (*freezing*) dan pencairan kembali (*thawing*) sangat mempengaruhi stabilitas dan fungsi-fungsi hidup sel membran. Penurunan persentase motilitas spermatozoa diatas terjadi karena adanya kerusakan struktur membran selama pendinginan sehingga proses metabolisme spermatozoa terganggu (Susilawati, 2005).

Persentase Spermatozoa hidup sapi aceh

Rata-rata persentase spermatozoa hidup sapi aceh pada berbagai lama ekuilibrasi setelah pembekuan (*thawing*) pada medium AndroMed[®] dapat dilihat pada tabel 2. Rata-rata persentase spermatozoa hidup sapi aceh setelah pembekuan tertinggi ditemukan pada kelompok perlakuan ekuilibrasi selama 4 jam, kemudian diikuti oleh kelompok perlakuan ekuilibrasi selama 6 jam, 2 jam dan 1 jam. Hasil analisis varian satu arah terhadap persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$). Rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah pembekuan pada perlakuan ekuilibrasi 4 jam lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi selama 1 jam dan ekuilibrasi selama 2 jam, namun tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi selama 6 jam. Rata-rata persentase spermatozoa hidup pada perlakuan ekuilibrasi selama 6 jam lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam. Sedangkan rata-rata persentase spermatozoa hidup pada perlakuan ekuilibrasi selama 1 jam tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi selama 2 jam. Hasil ini membuktikan bahwa lama ekuilibrasi berpengaruh secara nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase

pembekuan (*post thawing*). Ekuilibrasi selama 4 jam dan 6 jam menghasilkan persentase spermatozoa hidup sapi aceh yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) menyebutkan bahwa ekuilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian sperma yang berlebih-lebihan dapat dicegah. Ternyata persentase sperma hidup pada waktu ekuilibrasi singkat lebih sedikit bila dibandingkan dengan persentase sperma hidup pada waktu ekuilibrasi yang lebih panjang, hal ini disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kematian akibat tekanan penurunan suhu secara cepat tanpa adanya waktu tepat untuk penyesuaian diri terhadap keadaan tersebut. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Hafez (2004) bahwa efek toksik krioprotektan berhubungan dengan konsentrasi krioprotektan yang ditambahkan dan waktu pemaparan krioprotektan dengan semen sebelum dibekukan. Namun hal tersebut menyebabkan berkurangnya kesempatan gliserol untuk penetrasi secara sempurna ke dalam sel spermatozoa, sehingga terjadi kerusakan spermatozoa karena terbentuknya kristal es intraseluler. Pangestu (2002) menyatakan apabila suatu sel didinginkan terlalu cepat, maka air yang ada dalam sel akan keluar dalam jumlah sedikit sehingga belum mencapai tahap ekuilibrium. Air yang masih berada dalam sel tersebut akhirnya berubah bentuk menjadi es atau disebut *intracellular ice formation* (IIF) yang akan merusak sel spermatozoa dan mengakibatkan kematian sel. Apabila pendinginan sel berjalan relatif lambat, sel akan mempunyai waktu yang cukup untuk mengeluarkan air dari dalam sel sehingga konsentrasi intrasel meningkat akibatnya sel tidak mengalami pembentukan es intraselular melainkan hanya terbentuk di luar sel sebagai

kekurangan cairan serta akan terpapar lama dengan cairan ekstrasel yang berkonsentrasi tinggi. Dengan demikian laju pendinginan pada sel yang terlalu cepat maupun terlalu lambat akan mengakibatkan kerusakan dan kematian pada sel.

Menurunnya persentase spermatozoa hidup setelah pembekuan pada semua kelompok perlakuan pada penelitian ini kemungkinan disebabkan terjadinya perubahan polaritas pengencer. Kondisi ini akan mempengaruhi destabilitas membran spermatozoa yang akan berakibat bertambahnya kematian sel. Selama proses pembekuan terjadi depolarisasi atom-atom atau molekul-molekul penyusun membran yang mengakibatkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran (Hafez, 2004). Selanjutnya Aku *et al.* (2007) menyatakan bahwa ada beberapa hal yang menyebabkan kematian sel spermatozoa sehubungan dengan destabilisasi membran, diantaranya adanya perubahan susunan membran terutama susunan fosfolipid penyusun membran akibat cekaman dingin atau pembekuan. Selain itu penurunan persentase spermatozoa hidup juga disebabkan oleh suhu yang sangat rendah saat pembekuan mengakibatkan bocornya substansi vital dalam sperma sehingga enzim intraseluler, lipoprotein, ATP dan kalium intraseluler berkurang menyebabkan kerusakan membran plasma dan persentase spermatozoa hidup menurun.

Pada penelitian ini penurunan spermatozoa hidup sapi aceh setelah pembekuan masih tergolong normal karena menurut Toelihere (1993) penurunan kualitas spermatozoa sesudah pembekuan sekitar 50% spermatozoa mati selama pembekuan dan spermatozoa yang bertahan hidup umumnya mempunyai fertilitas yang rendah. Zahn *et al.* (2006) menyatakan bahwa komposisi protein plasma semen dan membran spermatozoa bervariasi antar

ketahanan spermatozoa terhadap pembekuan. Komposisi plasma semen tidak homeostatis dan bervariasi tidak hanya antar spesies, tetapi juga di antara individu dan antar ejakulasi dari hewan yang sama (Hafez 2000). Adanya Perbedaan karakteristik seminal plasma antar individu dan antar semen dari koleksi hewan yang sama tentu saja memengaruhi kualitas semen beku yang dihasilkan.

Persentase Membran Plasma Utuh (MPU) Spermatozoa

Membran plasma utuh merupakan suatu keadaan membran plasma yang harus tetap terjaga keutuhannya untuk mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa, motilitas dan kemampuan fertilisasi. Hal ini disebabkan karena membran plasma berfungsi sebagai pembatas sel kontinuous, yang melindungi organel-organel sel dari kerusakan mekanik dan mengatur lalu lintas keluar masuknya zat-zat makanan serta ion-ion yang diperlukan dalam proses metabolisme. Kerusakan pada membran plasma mengakibatkan terganggunya proses metabolisme dan proses fisiologis, sehingga menyebabkan kematian pada spermatozoa (Rasul *et al.*, 2001). Rata-rata persentase membran plasma utuh (MPU) spermatozoa sapi aceh pada berbagai lama waktu ekuilibrasi setelah ekuilibrasi dan pembekuan (*thowing*) pada medium AndroMed[®] pada berbagai lama waktu ekuilibrasi setelah ekuilibrasi dan pembekuan (*thowing*) pada medium AndroMed[®] terlihat pada Tabel 2. Rata-rata persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan tertinggi ditemukan pada kelompok perlakuan ekuilibrasi selama 4 jam, kemudian diikuti oleh ekuilibrasi selama 6 jam dan ekuilibrasi selama 2 jam dan ekuilibrasi selama 1 jam.

Sama halnya dengan persentase motilitas dan spermatozoa hidup, pada pengamatan setelah pembekuan atau pencairan kembali (*thowing*), persentase

ekuilibrasi selama 4 jam lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi selama 1 jam dan ekuilibrasi selama 2 jam, namun tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi selama 6 jam. Rata-rata persentase MPU spermatozoa pada perlakuan ekuilibrasi selama 6 jam lebih tinggi secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi 1 jam dan 2 jam. Sedangkan rata-rata persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan ekuilibrasi 1 jam tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan perlakuan ekuilibrasi 2 jam. Hasil ini membuktikan bahwa lama waktu ekuilibrasi berpengaruh secara nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh baik setelah ekuilibrasi maupun setelah pembekuan (*post thawing*). Ekuilibrasi selama 4 jam dan 6 jam menghasilkan persentase MPU spermatozoa sapi aceh yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekuilibrasi selama 1 jam dan 2 jam. Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) menyebutkan bahwa ekuilibrasi adalah periode yang diperlukan spermatozoa sebelum pembekuan untuk menyesuaikan diri dengan pengencer supaya sewaktu pembekuan kematian sperma yang berlebih-lebihan dapat dicegah. Ternyata persentase MPU spermatozoa pada waktu ekuilibrasi singkat lebih sedikit bila dibandingkan dengan persentase MPU spermatozoa pada waktu ekuilibrasi yang lebih panjang, hal ini disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kematian akibat tekanan penurunan suhu secara cepat tanpa adanya waktu tepat untuk penyesuaian diri terhadap keadaan tersebut.

Untuk mampu melindungi spermatozoa dari kerusakan selama proses pendinginan dibutuhkan waktu ekuilibrasi yang tepat agar terjadi perlindungan yang optimal. Pada penelitian ini persentase MPU terbaik

Hal ini diduga karena waktu ekuilibrasi 4 jam mampu memberikan kesempatan optimal gliserol untuk masuk ke dalam membrane plasma dan mengikat gugus fosfolipid sehingga mampu mengatasi ketidakstabilan membrane. Sedangkan pada lama ekuilibrasi 1 jam persentase MPU spermatozoa rendah diduga karena gliserol belum sepenuhnya masuk kedalam sel dan belum sepenuhnya mengikat fosfolipid sehingga pada spermatozoa terjadi kerusakan akibat pembekuan. Pada lama ekuilibrasi 6 jam, persentase MPU sedikit lebih rendah dibandingkan ekuilibrasi 4 jam, hal ini diduga karena waktu ekuilibrasi yang panjang akan merusak struktur membran. Pada waktu ekuilibrasi gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrasi yang lebih lama kemungkinan gliserol bersifat toksik sehingga akan merusak membran plasma spermatozoa dan menyebabkan gangguan motilitas dan viabilitas dari spermatozoa (Toelihere, 1993). Selanjutnya ditambahkan oleh Aku et al. (2007) bahwa akibat efek toksik dari gliserol maka membran plasma spermatozoa akan mengalami modifikasi struktur dan mengakibatkan terganggunya transport aktif zat-zat yang menjadi sumber energi bagi spermatozoa seperti glukosa, asam amino dan asam lemak. Akibat terganggunya mekanisme ini spermatozoa akan kekurangan energi sehingga viabilitas serta motilitasnya menurun.

Menurunnya persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan pada proses pendinginan dan pembekuan. Pendinginan merupakan pemicu stres spermatozoa karena akan merubah konfigurasi dari fosfolipid membran plasma dan mengganggu fungsi dan permeabilitas membran sel (Wongtawan et al., 2006). Hasil penelitian menunjukkan penurunan MPU

spermatozoa sapi aceh dari pengenceran sampai setelah pembekuan pada berbagai perlakuan lama ekuilibrasi secara berturut-turut sebesar 34,63±5,74%; 38,73±3,50%; 46,94±5,09% dan 43,61±3,02%. Rata-rata penurunan persentase MPU spermatozoa tersebut masih lebih rendah dibanding laporan penelitian Mondal *et al.*(2010) pada sapi perah yaitu 25%. 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. Persentase MPU yang bervariasi terjadi karena adanya karakteristik biofisik dan biokimia dari membran spermatozoa. Situmorang (2002) menyatakan akibat pembekuan terjadi penurunan kandungan fosfolipid dan kolesterol pada masing-masing bangsa dan individu pejantan. Kedua senyawa tersebut merupakan komponen membran. Fosfolipid 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 pendinginan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat ditarik simpulan bahwa lama ekuilibrasi berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa semen beku sapi aceh dalam medium AndroMed®. Lama ekuilibrasi 4 jam menghasilkan kualitas spermatozoa semen beku sapi aceh lebih baik dari 1 jam, 2 jam dan 6 jam.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, M.A.N., R.R. Noor., H. Martojo., D.D. Solihin, dan E. Handiwirawan. 2007. Keragaman fenotipik sapi aceh di Nanggroe Aceh Darussalam. *Journal of*

Indonesian Tropical Animal Agriculture. 32(1) : 11-21.

Affandhy, L., W.C. Pratiwi, dan D. Ratnawati. 2009. Kualitas semen pejantan sapi peranakan ongole dengan perlakuan pemberian suplemen berbeda. Loka Penelitian Sapi Potong, Semarang

Aku.S. Achmad, B. Purwantara, dan R.M. Toelihere, 2007. Preservasi Semen Domba Garut (Ovisaries) dalam berbagai Konsentrasi Bahan Pengencer Berbasis Lesitin Nabati, *Agriplus*, volume 17, No. 01:45-47.

Arfiantini, I., T.L. Yusuf, dan N. Graha. 2005. Longivitas dan Recovery Rate Pasca Thawing Semen Beku Sapi Fresian Holstein Menggunakan Bahan Pengencer yang Berbeda. *Buletin Peternakan*. 29 (2): 53-61.

Arifantini, R.I., T. Wresdiyati, dan E.F. Retnani. 2007. Kaji banding morfologi spermatozoa sapi bali (*Bos sondaicus*) menggunakan pewarnaan Williams, eosin, eosin nigrosin dan formol-saline. *Jurnal Sain Veteriner*. 24(1): 65-70.

Aminasari, P.D. 2009. Pengaruh Umur Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin. *Skripsi*. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.

Apryanti, C. 2012. *Pengaruh Waktu Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Pesisir Pre Dan Post Thawing*. Tesis. Program Studi Ilmu Ternak. Program Pasca sarjana Universitas Andalas. Padang.

Bearden. H. J. and J. W. Fuquay. 1984. *Applied Animal Reproduction*. 2nd ed. Reston Publishing Company, Inc, Virginia.

Best, B. 2006. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling injury in cryonics. *Anim. Reprod. Sci*. 60:41-51. Best, B. 2006. Viability, cryoprotectant toxicity and chilling

- injury in cryonics. *Anim. Reprod. Sci.* 60:41–51
- Dewi, A.S., Y.S. Ondho, dan E. Kurnianto. 2012. Kualitas semen berdasarkan umur pada sapi jantan jawa. *Anim. Agricult. J.* 1(2):126-133
- Diskeswannak Aceh, 2011. Profil sapi aceh, Banda Aceh
- Diskeswannak Aceh, 2016. Laporan Tahunan Dinas Kesehatan Hewan dan Peternakan Propinsi Daerah Istimewa Aceh
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafez. (2000). *Spermatozoa and Seminal Plasma. In Reproduction in Farm Animal.* 7th ed., E.S.E. Hafez (ed). Lea and Febiger Publishing, Philadelphia.
- Gunawan. 1998. *Upaya Peningkatan Mutu Genetik Sapi Aceh.* Pidato Pengukuhan dalam Jabatan Guru Besar Tetap Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala. Disampaikan pada Rapat Senat Terbuka Universitas Syiah Kuala, Sabtu 28 Maret 1998, Banda Aceh.
- Hafez, E. S. E. (2004). *Reproduction in Farm Animals.* 7th Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. P: 385-393. 394-398.
- Hanafi, H., M.N. Ihsan dan T. Susilawati, 2016 . Pengaruh Lama Ekuilibrasi Pada Proses Pembekuan Terhadap Kualitas Semen Sapi Wagyu Menggunakan Pengencer Andromed®, *J. Ternak Tropika Vol. 17, No.1: 31-41,*
- Herdis. 1998. Metode pemberian gliserol dan lama ekuilibrasi pada proses pembekuan semen kerbau lumpur. Tesis Program Pascasarjana IPB-Bogor
- Herold FC, de Haas K, Colenbrander B, Gerber D.. 2006. Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology* 66:1123-1130
- Komariah, I. Arfiantini, dan W. Nugraha. 2013. Kaji Banding Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental, Limousin, dan Friesian Holstein Terhadap Proses Pembekuan. *Buletin Peternakan.* 37 (3): 143-147.
- Kuswahyuni, I. S. 2009. Pengaruh Lingkar Scrotum dan Volume Testis Terhadap Volume Semen dan Konsentrasi Sperma Pejantan Simmental, Limousin dan Brahman. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.* Hal. 157-162. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro, Semarang.
- Mathevon, M., M. Buhr and J.C.M. Dekkers. 1998. Environmental, management and genetic factors affecting semen production in holstein bulls. *Journal Dairy Science.* 81:3321-3330.
- Minitub. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH and Co KG. Germany.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Agroland.* 16 (2): 172-179.
- Pangestu, M. 2002. Preservation of spermatozoa: methods and applications. Indonesian Forum on Reproduction. *Journal on Reproduction.* 1(2): 55 – 56
- Parrish, J. 2003. Techniques in domestic animal reproduction-evaluation and freezing of semen. http://www.wisc.edu/ansci_repro/. Diakses 14 September 2013
- Rasul Z, Ahmad N, Anzar M. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. *J Androl.* 22:278-283.
- Ratnawati, D., L. Affandhy, W.C. Pratiwi, dan P.W. Prihandini. 2008. Pengaruh pemberian suplemen tradisional terhadap kualitas semen

- pejantan sapi bali. Loka Penelitian Sapi Potong. Semarang
- Situmorang, P. 2002. *The Effects of Inclusion of Exogenous Phospholipid In Tris- Diluent Containing Adiferent Level of Egg Yolk on the Viability of Bull Spermatozoa*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor 7 (3) : 131-187
- Steel, R.G.D and Torrie, (1990). *Prinsip dan prosedur statistika suatu pendekatan biometrik*. Alih bahasa Bambang Sumantri, PT. Gramedia Pustaka Utama; Jakarta.
- Sukmawati E, R. I. Arifiantini, B. Purwantara. 2014. Daya Tahan Spermatozoa terhadap Proses Pembekuan pada Berbagai Jenis Sapi Pejantan Unggul JITV 19(3): 168-175.
- 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.
- Tambing S N. 1999. Efektivitas berbagai dosis gliserol di dalam pengencer tris dan waktu ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah [Tesis], Bogor. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere, M.R. (1985). *Fisiologi reproduksi pada ternak*. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M.R. (1993). *Inseminasi Buatan pada ternak*. CV Angkasa. Bandung.
- Turyan, 2005. Penurunan Motilitas Spermatozoa pada Berbagai Bangsa Sapi Akibat Proses Pembekuan. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Umar dan Maharani, 2005. Pengaruh Berbagai Waktu Ekuilibrasi Terhadap Daya Tahan Sperma Sapi Limousin dan Uji Kebuntingan, *Jurnal Agribisnis Peternakan*, 1. 17-21
- Wijono, D. B. (1999). Evaluasi Kemampuan Ejakulasi dan Kualitas Semen Sapi Potong Muda dan Dewasa. *Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner*.