

Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* dan Bertanduk pada Setiap Tahapan Proses Pembekuan

Motility and Viability of Spermatozoa of Polled and Horned Bali Bulls at Each Stage of the Freezing Process

Sri Gustina¹, Hasbi Hasbi^{2*}, Herry Sonjaya², Sudirman Baco², Abdul Latief Toleng², Mutmainna Mutmainna², Sitti Farida³

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan dan Perikanan, Universitas Sulawesi Barat, Jl. Prof. Dr. Baharuddin Lopa, Tande Timur, Majene, 91412

²Departemen Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Hasanuddin, Jl. Perintis Kemerdekaan Km.10, Makassar 90245

³Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan, Jl. Veteran Selatan No. 234 Makassar 90131, Indonesia

*Email korespondensi: E-mail: hasbi_fapetunhas@yahoo.com

(Diterima 02-06-2021; disetujui 22-11-2021)

ABSTRAK

Sapi bali merupakan sapi yang dikembangkan, dimanfaatkan dan dilestarikan sebagai sumberdaya ternak asli. Saat ini telah dikembangkan populasi sapi bali *polled*. Sapi bali *polled* merupakan sapi bali yang tanduknya tidak bertumbuh secara alami. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi bali *polled* dan bertanduk pada setiap tahapan proses pembekuan. Koleksi semen dilakukan dengan metode vagina buatan. Semen hasil koleksi selanjutnya dievaluasi secara makroskopik dan mikroskopik. Semen yang memenuhi persyaratan diproses lebih lanjut untuk dibekukan. Pejantan yang digunakan sebanyak 3 ekor *polled* dan 3 ekor bertanduk dengan umur 3,5 sampai 6 tahun. Parameter yang diamati meliputi motilitas dan viabilitas selama proses pembekuan sampai *post thawing*. Data yang diperoleh diuji dengan uji-t (sampel T-Test independen). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan nyata ($p>0,05$) antara sapi bali *polled* dan bertanduk terhadap persentase motilitas setelah pengenceran ($63,33\pm 1,92$ vs $65,00\pm 0,00$). Namun, terdapat perbedaan yang nyata ($p<0,05$) setelah equilibrasi yaitu $54,99\pm 1,35$ vs $60,00\pm 0,00$ dan *post thawing* $45,41\pm 0,83$ vs $49,58\pm 0,83$. Persentase viabilitas setelah pengenceran dan setelah equilibrasi tidak berbeda nyata ($p>0,05$) yaitu $81,94\pm 4,05$ vs $86,51\pm 1,26$ dan $72,80\pm 6,80$ vs $80,17\pm 2,74$. Namun, pada *post thawing* terdapat perbedaan yang nyata ($p<0,05$) yaitu $56,95\pm 3,74$ vs $72,55\pm 2,00$. Kesimpulannya bahwa persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi bali *polled* lebih rendah dibandingkan yang bertanduk.

Kata Kunci: motilitas, sapi bali *polled*, sapi bali bertanduk, spermatozoa, viabilitas

ABSTRACT

Bali cattle are cows and bulls that are developed, utilized and preserved as a native livestock resource. Currently, a population of polled bali cattle has been developed. Polled bali cattle are bali cattle whose horns do not grow naturally. The purpose of this study was to determine the percentage of motility and viability of spermatozoa of polled and horned bali cattle at each stage of the freezing process. Semen collection was carried out by the artificial vaginal method. The collected semen was then evaluated macroscopically and microscopically. The semen that meets the requirements is further processed to be frozen. The bulls used were 3 polled and 3 horned with an age of 3.5 to 6 years. Parameters observed



included motility and viability during the freezing process until post thawing. The data obtained were tested by t-test (independent sample T-Test). The results of this study indicated that there was no significant difference ($p>0.05$) between polled and horned bali cattle on the percentage of motility after dilution (63.33 ± 1.92 vs 65.00 ± 0.00). However, there was a significant difference ($p<0.05$) after equilibration (54.99 ± 1.35 vs 60.00 ± 0.00), and post thawing (45.41 ± 0.83 vs 49.58 ± 0.83). The percentage of viability after dilution and after equilibration was not significantly different ($p>0.05$), 81.94 ± 4.05 vs 86.51 ± 1.26 and 72.80 ± 6.80 vs 80.17 ± 2.74 . However, there was a significant difference in post thawing ($p<0.05$), 56.95 ± 3.74 vs 72.55 ± 2.00 . It can be concluded that the percentage of motility and viability of spermatozoa of polled bali cattle is lower than horned.

Keywords: motility, polled bali bull, horned bali bull, spermatozoa, viability

PENDAHULUAN

Sapi bali merupakan salah satu jenis sapi lokal Indonesia yang berasal dari bali yang populasinya saat ini telah menyebar hampir di seluruh wilayah di Indonesia (Oka, 2010). Dengan ciri khas tertentu dan juga mempunyai kemampuan adaptasi lingkungan yang tinggi sehingga sapi bali bisa dimanfaatkan dan dikembangkan serta juga dapat dilestarikan sebagai sumberdaya ternak asli Indonesia. Selain itu, sapi bali juga memiliki performa reproduksi yang tetap tinggi dan kemampuan produksi yang cukup bervariasi. Oleh sebab itu, sumberdaya genetik yang dimiliki sapi bali merupakan salah satu aset nasional sebagai plasma nutfah yang keberadaannya penting untuk dipertahankan dan agar bisa dimanfaatkan secara lestari dengan berbagai keunggulan spesifik yang dimiliki. Saat ini, sapi bali juga telah tercatat sebagai salah satu bangsa sapi yang ada di dunia yang masuk dalam list FAO sebagai aset dunia (DGLS, 2003).

Pengembangan sapi potong lokal di Sulawesi Selatan secara tidak sengaja telah ditemukan sapi bali tanpa tanduk atau yang biasa diistilahkan sapi *polled*. Sebagai ciri utama, sifat *polled* pada sapi bali mengakibatkan tingkah lakunya menjadi lebih jinak sehingga akan mempermudah dalam penanganan/pemeliharaan (Zulkharnaim et al., 2017). Kondisi tempramen dan tingkah laku sapi potong sangat penting untuk keamanan dan keselamatan disaat pemeliharaan dan termasuk keselamatan peternaknya. Selain itu, keuntungan lain dari sifat *polled* ini adalah lebih mudah dalam sistem pemeliharaan yang berdampak terhadap produktivitas dan juga kualitas dagingnya, seperti halnya mengurangi resiko terluka yang sering terjadi akibat perkelahian dengan tanduk, mampu mencegah terjadinya memar pada karkas serta terjadi kerusakan pada kulit. Sifat *polled* ini juga memberikan keuntungan dari aspek pemoangan tanduk (*Dehorning*) yang membutuhkan biaya lebih, karena tidak perlu lagi dilakukan. Seleksi terhadap sapi *polled* menjadi faktor yang penting

terutama dalam hal manajemen budidaya ternak yang modern (Brockmann et al., 2000). Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produktivitas ternak sapi bali *polled* adalah menerapkan teknologi inseminasi buatan (IB) dengan menggunakan semen beku. Namun sampai saat ini, informasi terkait dengan kualitas semen sapi bali *polled* khususnya motilitas dan viabilitas selama proses pembekuan sampai *post thawing* belum ada sehingga penelitian ini sangat perlu untuk dilakukan.

Motilitas dan viabilitas merupakan merupakan dua parameter yang umum dinilai untuk menguji kualitas semen seekor pejantan. Menurut Zulyazaini et al. (2016) motilitas sebagai salah satu indikator penting terhadap kualitas semen dan penentuan keberhasilan fertilisasi, sedangkan viabilitas merupakan kemampuan hidup spermatozoa. Parameter viabilitas bisa dijadikan indikator dalam melihat integritas struktur membran plasma pada spermatozoa (Sukmawati et al., 2014).

MATERI DAN METODE

Materi

Materi yang digunakan adalah tiga ekor pejantan sapi bali *polled* dan tiga ekor pejantan sapi bali bertanduk yang berumur 3,5 sampai 6 tahun.

Prosedur Penelitian

Koleksi dan evaluasi semen. Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan sesuai standar operasional prosedur Unit Pelaksana Teknis Pelaksanaan Inseminasi Buatan dan Produksi Semen, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Sulawesi Selatan. Segera setelah koleksi, semen dievaluasi secara makroskopis meliputi volume, warna, dan konsistensi dan juga secara mikroskopis meliputi persentase motilitas, viabilitas, dan juga banyaknya konsentrasi spermatozoa tiap ml (Arifiantini 2012). Semen yang digunakan dalam penelitian ini adalah yang memiliki gerakan massa $\geq++$ dan motilitas $\geq 70\%$ (Sukmawati et al., 2014).

Proses pengenceran, pengemasan straw dan pembekuan semen. Semen yang memenuhi persyaratan diencerkan menggunakan andromed dengan konsentrasi 100×10^6 spermatozoa per ml kemudian dilakukan pemeriksaan kualitas semen secara mikroskopis meliputi persentase motilitas dan viabilitas. Setelah itu, dikemas dalam minitraw 0,25 ml dan diekuilibrasikan dalam refrigerator ($4-5^\circ\text{C}$) selama 2-4 jam. Kemudian dilakukan lagi pemeriksaan kualitas semen secara mikroskopis meliputi persentase motilitas dan viabilitas. Selanjutnya dilakukan *pra-freezing* pada uap N_2 cair selama 10 menit kemudian dibekukan (Sukmawati et al., 2014).

Thawing semen beku. *Thawing* (pencairan kembali) semen dilakukan menggunakan air hangat dengan suhu 37°C selama 20 detik. Selanjutnya dilakukan evaluasi kualitas semen diantaranya tingkat motilitas dan viabilitas (Sukmawati et al., 2014).

Pengujian motilitas dilakukan dengan menggunakan gelas obyek yang ditetesi 1 tetes semen kemudian ditutup dengan *cover glass*, kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop perbesaran 10×40 kali. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan antara spermatozoa yang bergerak progresif dengan yang bergerak mundur atau hanya bergerak melingkar/berputar (Masyitoh et al., 2018). Motilitas spermatozoa dihitung menggunakan rumus (1).

$$\% \text{ Motilitas} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa yang Progresif}}{\text{Total Jumlah Spermatozoa yang diamati}} \times 100\% \dots (1)$$

Pengujian viabilitas. Pengukuran viabilitas dilakukan dengan menghitung persentase spermatozoa hidup melalui teknik pewarnaan eosin-nigrosin. Campuran semen dan larutan

pewarna dengan perbandingan 1:1 kemudian dibuat preperat ulas dan dianginkan atau dikeringkan. Spermatozoa yang hidup terlihat tidak berwarna karena tidak menyerap warna, sedangkan spermatozoa yang mati akan berwarna merah karena menyerap zat warna. Spermatozoa yang hidup kemudian dihitung dengan bantuan mikroskop perbesaran 10×40 kali menggunakan rumus (2):

$$\% \text{ Hidup} = \frac{\text{Jumlah Spermatozoa}}{\text{Jumlah Total Sperma}} \times 100\% \dots (2)$$

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 perlakuan (sapi bali jantan *polled* dan bertanduk) dengan masing-masing 4 kali penampungan semen sebagai ulangan (Steel & Torrie, 1993).

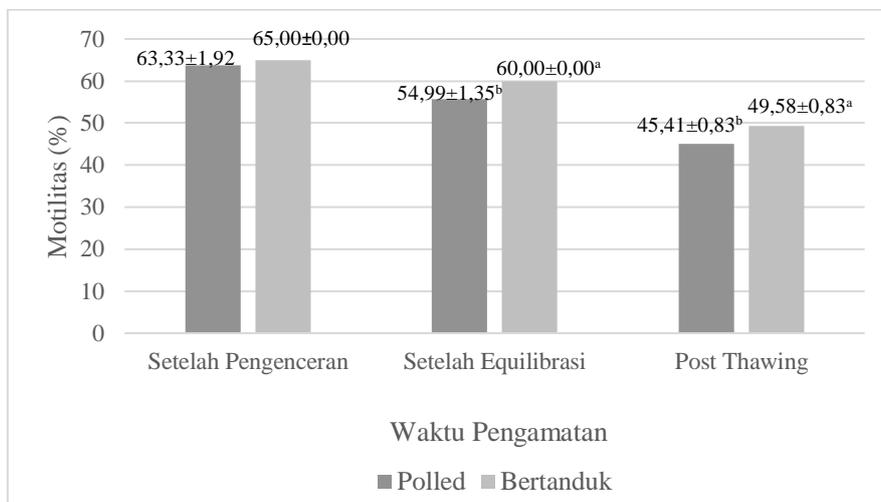
Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji banding, yaitu analisis statistik uji t (t-test Independent sample), untuk membandingkan sampel sapi bali jantan *polled* dengan yang bertanduk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Motilitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* dan Bertanduk

Motilitas merupakan kemampuan gerak spermatozoa untuk dapat membuahi sel telur (Wahyuningsih et al., 2013). Untuk mencapai tempat fertilisasi, sangat dibutuhkan daya gerak yang progresif oleh spermatozoa saat berada di saluran kelamin betina (Sarastina et al., 2012). Motilitas spermatozoa sapi bali *polled* dan bertanduk dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Motilitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* dan Bertanduk

Berdasarkan hasil penelitian (Gambar 1.) menunjukkan bahwa persentase motilitas spermatozoa sapi bali *polled* dan bertanduk setelah pengenceran tidak berbeda nyata ($p>0.05$). Hal ini menunjukkan bahwa kualitas semen sapi bali *polled* dan bertanduk sampai pada tahap setelah pengenceran masih sama. Persentase motilitas spermatozoa sapi bali *polled* dan bertanduk setelah pengenceran masih memenuhi standar dan layak untuk diproses lebih lanjut. Hal ini sesuai dengan SNI (2017) tentang syarat spermatozoa sapi dikatakan hidup dan bergerak maju (motil) setelah pengenceran adalah 55%. Sedangkan persentase motilitas spermatozoa sapi bali *polled* setelah equilibrasi dan *post thawing* nyata lebih rendah ($p<0,05$) dibandingkan dengan bertanduk ($54,99\pm 1,35$ vs $60,00\pm 0,00$) dan ($45,41\pm 0,83$ vs $49,58\pm 0,83$). Hal ini menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa sapi bali *polled* memiliki ketahanan yang lebih rendah selama equilibrasi dan pembekuan dibandingkan dengan spermatozoa sapi bali bertanduk. Ketahanan spermatozoa terhadap suhu dipengaruhi oleh kemampuan spermatozoa beradaptasi dengan gliserol pada saat proses equilibrasi. Fungsi gliserol yaitu melindungi spermatozoa terhadap efek-efek letal selama proses pembekuan serta dapat memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk dalam medium pada saat pembekuan, sehingga mampu mencegah terjadinya kerusakan membran sel spermatozoa pada selama penurunan suhu (*cooling rate*) (Mumu, 2009).

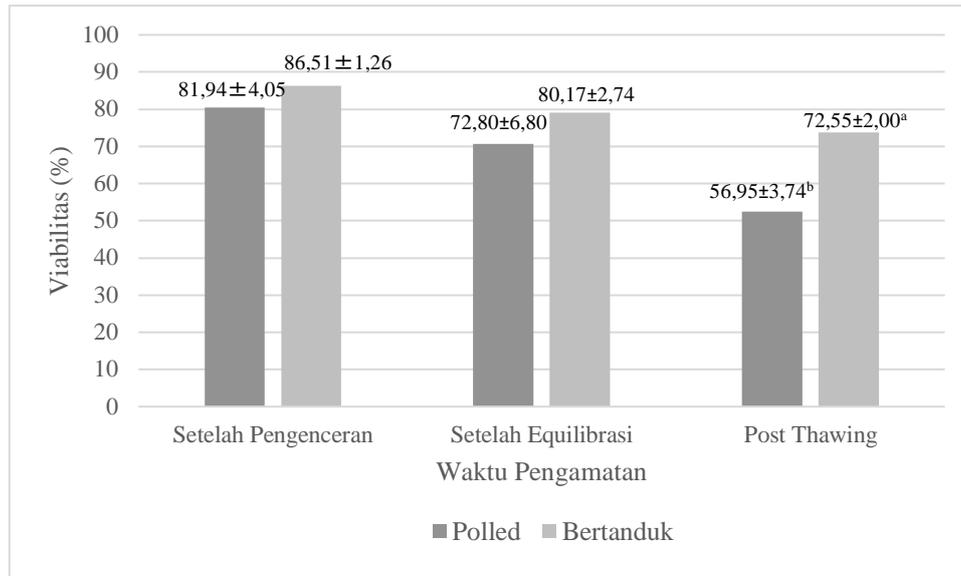
Penurunan persentase motilitas spermatozoa setelah pengenceran hingga setelah equilibrasi diduga diakibatkan oleh perubahan suhu dan lama waktu equilibrasi. Novianto *et al.* (2014) menyatakan bahwa lama equilibrasi yaitu selama 2-6 jam agar bisa menyeimbangkan cairan intraseluler dengan pengencer yang mengandung gliserol sebelum proses pembekuan dimulai. Lebih lanjut Hafez (2004) menjelaskan bahwa gliserol yang terkandung dalam pengencer membutuhkan waktu yang optimum selama equilibrasi.

Persentase motilitas spermatozoa sapi bali *polled post thawing* lebih rendah dibandingkan sapi bali bertanduk. Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa sapi bali *polled* memiliki *recovery*

rate yang lebih rendah dibandingkan dengan sapi bali bertanduk setelah proses pembekuan. Motilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh adanya perbedaan seminal plasma dan suhu saat dilakukan evaluasi. Setiap individu sapi memiliki seminal plasma yang berbeda. Seminal plasma adalah sumber energi bagi spermatozoa. Neuhauser *et al.* (2013) menjelaskan bahwa energi yang dihasilkan ini akan dipakai sebagai pergerakan. Lebih lanjut Ratnawati *et al.* (2019) melaporkan bahwa motilitas spermatozoa dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya suhu, pakan, bangsa sapi, frekuensi ejakulasi, serta ketuhan membran spermatozoa. Sukmawati *et al.* (2014) menjelaskan bahwa selama pembekuan terjadi perubahan suhu dan osmolaritas yang ekstrim sehingga akan merusak komposisi lipid membran plasma yang berdampak pada menurunnya motilitas sperma. Hal yang sama juga terjadi setelah proses *thawing* dimana spermatozoa sangat rentan terhadap kerusakan yang dapat diakibatkan oleh terjadinya perubahan tekanan osmotik sel yang drastis dan hanya spermatozoa yang mempunyai membran plasma yang kuat yang mampu bertahan (Maxwell & Watson, 1996). Namun demikian, persentase motilitas spermatozoa *post thawing* pada penelitian ini masih layak untuk digunakan dalam program inseminasi buatan.

Viabilitas Spermatozoa Sapi Bali Polled dan Bertanduk

Viabilitas yaitu persentase hidup spermatozoa. Pengukuran viabilitas dilakukan dengan menghitung jumlah spermatozoa yang hidup dan mati pada preparat ulas, yang didasarkan atas daya permeabilitas membran spermatozoa terhadap cairan yang diberi pewarna eosin maupun kombinasi eosin nigrosin (Noviana, 2016). Parameter viabilitas tersebut bisa dijadikan sebagai indikator untuk melihat integritas struktur membran pada spermatozoa (Sukmawati *et al.*, 2014). Terdapat korelasi positif antara viabilitas dengan motilitas yang mana ditentukan oleh integritas membran plasma spermatozoa (Azzahra *et al.*, 2016). Viabilitas spermatozoa sapi bali *polled* dan bertanduk dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Viabilitas Spermatozoa Sapi Bali *Polled* dan Bertanduk.

Persentase viabilitas spermatozoa baik setelah pengenceran maupun setelah equilibrasi pada sapi bali *polled* dan bertanduk (Gambar 2) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p > 0,05$). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa viabilitas spermatozoa sapi bali *polled* dan bertanduk sama dan memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut menjadi semen beku. Garner & Hafez (2000) menjelaskan bahwa minimal 60-75% spermatozoa hidup untuk pengamatan viabilitas yang selanjutnya bisa dilakukan pengenceran dan pembekuan semen. Membran plasma yang utuh merupakan salah satu faktor penentu persentase hidup spermatozoa. Membran plasma pada spermatozoa berfungsi untuk melindungi organel pada sitoplasma dan sebagai media transport elektrolit yang penting untuk metabolisme spermatozoa (Arsiwan *et al.*, 2014). Membran plasma yang rusak dapat mempengaruhi struktur, fungsi fisiologis, metabolisme hingga perubahan molekuler yang dapat menyebabkan spermatozoa mati (Peris-Frau *et al.*, 2020). Viabilitas berkorelasi positif dengan motilitas berdasarkan kekuatan membran plasma spermatozoa (Azzahra *et al.*, 2016).

Viabilitas spermatozoa sapi bali *polled* setelah equilibrasi meskipun secara statistik tidak berbeda nyata, tetapi memperlihatkan bahwa pada sapi bali *polled* ada kecenderungan lebih rendah dibandingkan

dengan bertanduk. Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa sapi bali *polled* memiliki ketahanan yang lebih rendah dibandingkan spermatozoa sapi bali bertanduk terhadap proses pendinginan. Hal tersebut diduga diakibatkan oleh pengaruh *cold shock*. Menurut Pubiandaraa *et al.* (2016) bahwa *cold shock* terkait dengan perubahan fosfolipid sebagai penyusun membran plasma, dimana perubahan yang terjadi dapat mengakibatkan kerusakan pada membran sehingga terjadi influks ion-ion seperti kalsium yang tinggi ke dalam sel. Rusaknya membran plasma mengakibatkan sperma menyerap warna pada saat pengujian. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Anggraini *et al.* (2018) yang menyatakan bahwa apabila spermatozoa mati maka akan menyerap zat warna yang ada di sekitarnya sedangkan yang hidup tidak menyerap zat warna. Hal ini disebabkan karena membran sel spermatozoa yang mati mengalami kerusakan sehingga mudah menyerap zat warna.

Berdasarkan Gambar 2 memperlihatkan bahwa viabilitas spermatozoa *post thawing* pada sapi bali *polled* nyata lebih rendah dibandingkan dengan sapi bali bertanduk ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa sapi bali *polled* lebih mudah mati ketika dilakukan proses pembekuan dibandingkan dengan sapi bali bertanduk. Menurut Zamuna *et al.* (2015)

bahwa komposisi membran spermatozoa dan daya tahan Hal inilah yang diduga menjadi penyebab perbedaan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa pada sapi bali *polled* dan bertanduk. Sapi bali *polled* memiliki persentase motilitas dan viabilitas lebih rendah dibandingkan dengan sapi bali bertanduk.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kualitas spermatozoa *post thawing* sapi bali *polled* lebih rendah dibandingkan sapi bali bertanduk, namun masih dapat digunakan sebagai semen beku berdasarkan SNI Semen Beku-Bagian I: Sapi.

KONFLIK KEPENTINGAN

Penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dalam hubungan keuangan, pribadi, atau lainnya dengan orang atau organisasi lain yang terkait dengan materi yang dibahas dalam naskah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi/Badan Riset dan Inovasi Nasional-Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) yang telah membiayai kegiatan penelitian ini dengan nomor kontrak 46/E1/PRN/2020 tanggal 1 Juli 2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, M.L., Dasrul, J. Melia, T.M. Lubis, Rosmaidar, & Hamdan. 2018. Motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan menggunakan pengencer sitrat kuning telur dengan penambahan ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*). JIMVET 2(1):130-138.
- Arifiantini, I. 2012. Teknik Koleksi Dan Evaluasi Semen pada Hewan. IPB Press. Bogor.
- Arsiwan, A., T. Saili, L.A. Ba'a, & S. Rahadi. 2014. Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing peranakan ettawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. Jitro 1(1):79-87.
- Azzahra, F.Y., E.T. Setiatin, & D. Samsudewa. 2016. Evaluasi motilitas dan pesentase hidup semen segar sapi po kebumen pejantan muda. Jurnal Sains Peternakan Indonesia (2):99-107.
- Brockmann, G.A., J. Martin, F. Teuscher, & M. Schwerin. 2000. Marker controlled inheritance of the *polled* locus in Simmental cattle. Arch Tierz 43(3): 207-212.
- [DGLS] Directorate Generale of Livestock Services. 2003. National Report on Animal Genetic Resources Indonesia. Directorate of Livestock Breeding, Indonesia.
- Fazrien, W.A., E. Herwijanti, & N. Isnaini. 2020. Pengaruh perbedaan individu terhadap kualitas semen segar dan beku pejantan unggul sapi bali. Sain Peternakan 118(1):60-65.
- Garner, D.L., & E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In Reproduction in Farm Animal. 7th ed., E.S.E. Hafez (ed). Lea & Febiger Publishing. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. 2004. Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Lea & Febiger Publishing. Philadelphia. P: 385-393. 394-398.
- Masyitoh, H., T.Y Suprayogi, R.N. Praja, P. Srinto, S.P Madyanti, & A.L. Saputo. 2018. Persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa kambing sapera dalam pengencer tris kuning telur dan susu skim kuning telur before freezing. Jurnal Medik Veteriner 1(3):105-112.
- Maxwell, W.M.C., & P.F. Watson. 1996. Recent Progress in the Preservation of Ram Semen. Animal Reproduction Science 42(1-4):55-65.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas semen sapi simental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. Jurnal Agroland 16(2):172-179.
- Neuhauser, S., S. Rheinfeld, & J. Handler. 2013. Motility of fresh and frozen-thawed stallion sperm from three

- segments of the epididymal cauda and the effect of post-thaw seminal plasma addition on motility. *Journal of Equine Veterinary Science* 33(11):942-949.
- Noviana, M.J.S. 2016. Uji Viabilitas spermatozoa sapi bali jantan dengan menggunakan larutan clorida (NaCl) yang berbeda level. *Jurnal of animal Science* 1(2):28-29.
- Novianto, B.R., Sudarno, & E.D. Masithah. 2014. Pengaruh perbedaan konsentrasi gliserol dalam susu skim kuning telur untuk proses penyimpanan sperma beku terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan patin (*Pangasius pangasius*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 6(1):1-6.
- Oka, I.G.L. 2010. Conservation and genetic improvement of bali cattle. *Proc. Conservation and Improvement of Wordl Indigenous Cattle*. 110-117.
- Peris-Frau, P., A.J. Soler, M. Iniesta-Cuerda, A. Martín-Maestro, I. Sánchez-Ajofrín, D.A. Medina-Chávez, & et al. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int J Mol Sci* 21(8):2781.
- Pubiandaraa, S., S. Sri, & H. Madi. 2016. Pengaruh penambahan dosis rafinosa dalam pengencer sitrat kuning telur terhadap motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa sapi ongole. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 4(4):292-299.
- Ratnawati, D., N. Isnaini, & T. Susilawati. 2019. Faktor-faktor yang mempengaruhi analisis motilitas spermatozoa dengan menggunakan CASA. *Wartazoa* 29(3):145-152.
- Sarastina, T., Susilawati, & G. Ciptadi. 2012. Analisa beberapa parameter motilitas spermatozoa pada berbagai ternak menggunakan computer assisted semen analysis (CASA). *Jurnal Ternak Tropika* 6(2):1-12.
- [SNI] Standar Nasional Indonesia. 2017. Semen Beku-Bagian 1: Sapi. Badan Standardisasi Nasional. Jakarta.
- Steel, R.G.D. & J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika: Suatu Pendekatan Biometric. Alih Bahasa: B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Sukmawati, E., R.I. Arifiantini, & B. Purwantara. 2014. Daya tahan spermatozoa terhadap proses pembekuan pada berbagai jenis pejantan unggul. *JITV* 19(3):168-175.
- Wahyuningsih, A., D.M. Saleh, & Sugiyanto. 2013. Pengaruh umur pejantan dan frekuensi penampungan terhadap volume dan motilitas semen segar sapi simmental di balai inseminasi buatan lembang. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 1(3):947-953.
- Zamuna, A.A.K.K.M., T. Susilawati, G. Ciptadi, & Marjuki. 2015. Perbedaan kualitas semen dan produksi semen beku pada berbagai bangsa sapi potong. *Jurnal Ternak Tropika* 16(2): 1-6.
- Zulkharnaim., S. Baco, M. Yusuf, & L. Rahim. 2017. Comparison of body dimension of bali *polled* and horned cattle in South Sulawesi. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 36(5):133-139.
- Zulyazaini, D., S. Wahyuni, M. Akmal, & M.A.N. Abdullah. 2016. Karakteristik semen dan komposisi kimia plasma seminaslis sapi aceh yang diperihara di bibd saree aceh besar. *Agripet* 16(2): 121-130.