

INTEGRITAS MEMBRAN PLASMA SPERMATOZOA SAPI ACEH PASCA PEMBEKUAN DALAM MEDIA SITRAT KUNING TELUR DENGAN WAKTU EKUILIBRASI YANG BERBEDA

The Plasma Membrane Integrity Of Post-Freezing Aceh Cattle Spermatozoa In Yolk-Citrate Medium In Different Equilibration Times

Nikhofebri Hidayat¹, Dasrul², Hamdan², Husnurrisal² Muslim Akmal³, Triva Murtina Lubis⁴

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

³Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

⁴Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

E-mail: nikhofebrihidayat@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu ekuilibrasi terhadap integritas membran plasma spermatozoa sapi aceh pasca pembekuan dengan media sitrat kuning telur. Sampel yang digunakan adalah semen sapi segar yang dikoleksi menggunakan vagina buatan. Sampel semen dikoleksi dari 1 ekor sapi aceh jantan sehat berumur 3 tahun sebanyak satu kali dalam seminggu selama lima minggu. Semen yang berkualitas baik diencerkan dengan pengencer sitrat kuning telur. Selanjutnya dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dengan waktu ekuilibrasi yang berbeda-beda (K₁); 2 jam (K₂); 3 jam (K₃); 4 jam (K₄); 5 jam (K₅); 6 jam dan masing-masing kelompok diulangi sebanyak 5 kali. Kemudian dilakukan pembekuan dengan metode vitrifikasi di atas uap nitrogen cair (suhu sekitar (-110 °C) selama 13 menit dan disimpan di dalam kontainer berisi nitrogen cair (-196°C). Setelah penyimpanan selama 1 minggu, masing-masing semen beku dilakukan *thawing* dan selanjutnya dihitung persentase membran plasma utuh (MPU) setiap *straw* perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan. Rata-rata MPU spermatozoa sapi aceh pada media sitrat kuning telur K₁; K₂; K₃; K₄ dan K₅ adalah 34,52±4,59%; 52,06±5,86%; 57,24±5,07%; 48,22±3,70% dan 5,44±1,07%. Hasil penelitian menunjukkan waktu ekuilibrasi berpengaruh nyata (P<0,05) terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh. Penggunaan waktu ekuilibrasi 4 jam menghasilkan MPU spermatozoa sapi aceh yang lebih baik dibandingkan lama waktu ekuilibrasi lainnya pasca pembekuan.

Kata kunci: sapi aceh, membran plasma utuh, waktu ekuilibrasi, sitrat kuning telur

ABSTRACT

This study is aimed to determine the effect of equilibration time on the integrity of aceh cattle spermatozoa plasma membrane. The sample used was fresh cattle semen collected using artificial vagina. The semen samples were collected from one healthy cattle aged three years old once in a week during five weeks. Good quality semen was divided into five treatment groups with different equilibration times which are (K₁); 2 hours (K₂); 3 hours (K₃); 4 hours (K₄); 5 hours (K₅); 6 hours and the collecting process was repeated five times for each group. Then, the samples were frozen by vitrification method on the top of liquid nitrogen vapor (ambient temperature (-110 °C)) for 13 minutes and stored in containers of liquid nitrogen (-196°C). After one week of storage, each frozen semen was thawed and the percentage of the intact plasma membrane (MPU) was calculated for each treatment of straw. The data obtained were analyzed by using analysis of variance (ANOVA) and continued by using Duncan test. The mean of MPU aceh cattle spermatozoa on citrate yolk medium K₁; K₂; K₃; K₄ and K₅ are 34,52±4,59%; 52,06±5,86%; 57,24±5,07%; 48,22±3,70% and 5,44±1,07%. The study results showed equilibration times have a real impact (P<0,05) on the of MPU aceh cattle spermatozoa. The use of a 4-hour equilibration time resulted in a better percentage of MPU of aceh cattle spermatozoa compared to other post-freezing equilibration times.

Keywords: aceh cattle, intact plasma membrane, equilibration times, citrate yolk

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Sapi aceh merupakan salah satu plasma nutfah sapi potong lokal yang ada di Indonesia selain sapi bali, sapi madura dan sapi pesisir. Sapi aceh termasuk tipe sapi potong berukuran kecil yang mempunyai daya tahan terhadap lingkungan yang buruk seperti krisis pakan, air, penyakit parasit dan temperatur panas (Abdullah, 2008).

Salah satu upaya mempercepat peningkatan populasi ternak sapi aceh dapat dilakukan melalui pemanfaatan teknologi inseminasi buatan (IB) menggunakan semen dari pejantan sapi aceh murni. Aplikasi IB di samping mampu meningkatkan produktivitas dan mutu genetik

ternak, juga diharapkan akan dapat mempercepat penyebaran bibit ke wilayah produksi ternak terpencil. Namun aplikasi IB sapi aceh masih menemukan banyak kendala, terutama menyangkut penyediaan semen beku secara berkesinambungan dan belum ditemukannya bahan pengencer yang tepat untuk mempertahankan kualitas spermatozoa setelah pembekuan (Zulyazaini dkk., 2016).

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel spermatozoa tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati dkk., 2003). 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 seperti gliserol dan ethilen glicol selama proses pembekuan sangat dipengaruhi oleh waktu ekuilibrase (Tambing, 1999; Muzakir dkk., 2017).

Waktu ekuilibrase 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 zat pelindung 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 ekuilibrase dilakukan dengan cepat maka air yang ada dalam sel akan keluar dalam jumlah sedikit sehingga belum mencapai tahap ekuilibrium, dan apabila dilakukan dengan lambat sel akan mempunyai waktu yang cukup untuk mengeluarkan air dari dalam sel sehingga konsentrasi intrasel meningkat akibatnya sel tidak mengalami pembentukan es intraseluler melainkan hanya terbentuk di luar sel (Mumu, 2009). Waktu ekuilibrase pada proses pembekuan semen berbeda-beda pada berbagai jenis semen, individu pejantan, bahan pengencer dan metode pembekuan yang digunakan (Afriantini dkk., 2005; Febriani dkk., 2014; Hanifi dkk., 2016).

Menurut Hafez (2004) penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin dapat merusak integritas membran spermatozoa, yang pada akhirnya dapat menyebabkan penurunan viabilitas dan motilitas spermatozoa. Lebih lanjut Isnawati dkk. (2016) menyatakan bahwa kejutan dingin menyebabkan terjadinya perpindahan ion melewati membran dan penurunan kandungan lipid (fosfolipid dan kolestrol) yang sangat berperan dalam mempertahankan integritas struktural membran plasma. Evaluasi integritas membran spermatozoa dapat dilihat dari MPU. Kerusakan membran plasma utuh dapat digunakan sebagai salah satu indikator penyebab berkurangnya fungsi spermatozoa karena sedikitnya komponen seluler dan inaktivasi dari protein utama sehingga menurunkan fertilitas spermatozoa (Fannesia dkk., 2015).

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan suatu penelitian yang mengkaji integritas membran plasma spermatozoa sapi aceh pasca pembekuan dalam media sitrat kuning telur dengan waktu ekuilibrase yang berbeda.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan sampel semen sapi segar yang diencerkan dalam sitrat kuning telur dengan konsentrasi 20% serta dengan berbagai lama waktu ekuilibrase (2 jam, 3 jam, 4 jam, 5 jam, 6 jam). Setiap kelompok dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola searah. Hewan yang dipergunakan sebagai sumber semen adalah 1 ekor

sapi aceh jantan dewasa dengan umur 3 tahun. Ternak ditempatkan dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa hijauan segar sebanyak 10% BB dan konsentrat sebanyak 1% dengan pemberian dua kali dalam sehari, serta air minum yang diberikan secara *ad libitum*.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu unit vagina buatan, mikroskop, tabung penampung semen, *erlenmeyer*, tabung reaksi, *haemocytometer*, pH meter, mini straw (0,25 ml), rak mini *straw*, *refrigerator*, pipet tetes, gunting, termos es, *beaker glass*, gelas objek, *stopwatch*, gelas penutup, kontainer nitrogen cair, mesin pendingin (*Cool top*), *sterofom*, dan *thermometer*. Bahan yang digunakan adalah semen segar sapi aceh, kuning telur ayam ras, pewarna eosin 0,2%, NaCl fisiologis, tisu, aquadest, pelicin (*jelly*), alkohol 70%, bahan pengencer natrium sitrat, minyak emersi, gliserol, nitrogen cair, dan antibiotik.

Dalam erlenmeyer yang bersih dan kering tambahkan 2,9 gr Na-sitrat dilarutkan dalam 100 ml akuabidest. Kemudian dipanaskan dalam pemanas air yang bersuhu 92°C selama 5-10 menit sampai jernih sambil diaduk. Kemudian larutan tersebut didinginkan sampai mencapai suhu kamar. Permukaan kerabang telur ayam dihapus hamakan dengan kapas yang diberi alkohol 70%. Bagian ujung telur yang runcing dipecahkan dengan pinset lalu putih telur dipisahkan dari kuning telur. Kemudian kuning telur diletakkan ke atas kertas saring, agar sisa putih telur meresap pada kertas saring. Setelah itu selaput vitelin kuning telur dipisahkan dari kuning telur menggunakan pinset dan masukkan ke dalam erlenmeyer. sitrat kuning telur dituang dengan perbandingan 4:1 ke dalam erlenmeyer 100 ml, diaduk hingga merata. Tambahkan antibiotik penisilin 1000 IU/ml dan streptomisin 1 mg/ml ke dalam pengencer dan diaduk hingga rata, kemudian pengencer tersebut dimasukkan ke dalam lemari pendingin.

Setelah penampungan semen dilakukan pemeriksaan kualitas semen secara makroskopis (volume, warna, konsistensi, dan pH) dan mikroskopis (konsentrasi spermatozoa, persentase motilitas spermatozoa, spermatozoa hidup spermatozoa abnormalitas, dan membran plasma utuh spermatozoa. Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa $> 600 \times 10^6$ /ml dan motilitas progresif $> 70\%$, abnormalitas $< 20\%$ digunakan sebagai sampel (*Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang Bandung, 2011*)

Semen yang telah diencerkan dan dikemas di dalam mini straw (0,25 ml), kemudian di ekuilibrasikan di dalam lemari pendingin (*cool top*) bersuhu 5°C dengan berbagai lama waktu ekuilibrasikan yaitu; pada perlakuan pertama selama 2 jam (K1); pada perlakuan kedua selama 3 jam (K2); pada perlakuan ketiga selama 4 jam (K3); pada perlakuan keempat selama 5 jam (K4); pada perlakuan kelima selama 6 jam (K5). Selanjutnya dibekukan dengan metode vitrifikasi, straw disusun pada rak tabung reaksi dan straw diletakkan di atas permukaan nitrogen cair (suhu sekitar -110°C) setinggi 2-3 cm di atas permukaan nitrogen selama 13 menit. Kemudian straw dimasukkan ke dalam nitrogen cair (suhu -196°C) dan di simpan dalam kontainer. Setelah disimpan selama 7 hari, masing-masing straw beku dicairkan kembali (*thawing*) dengan cara memasukkan straw ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik. Parameter integritas spermatozoa yang diamati setelah pembekuan adalah MPU spermatozoa.

Keutuhan membran plasma dilakukan menggunakan *osmotic resistance test (ORT)* atau *hyposmotic swelling (HOS) test* (Fonseca dkk., 2005). dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Satu tetes larutan yang telah diinkubasi diteteskan di atas gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup. Evaluasi dilakukan minimal 200 spermatozoa. Dihitung menggunakan mikroskop phase kontras pembesaran 400 X. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar.

Analisis Data

Data persentase MPU spermatozoa penelitian ini dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah. Selanjutnya diuji dengan uji Duncan (Gaspersz, 1991). Analisis data dilakukan dengan bantuan program SPSS versi 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penilaian kualitas semen segar sapi aceh setelah 6 kali penampungan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segar sapi aceh setelah koleksi.

Parameter	Hasil Pengamatan
A. Makroskopis	
Volume (ml)	4,36 ± 0,77
Warna	Krem keputihan
Konsistensi	Sedang – Kental
pH	7,00 ± 0,00
Bau	Khas
B. Mikroskopis	
Gerak massa	++ sampai +++
Motilitas (%)	72,00 ± 4,47
Konsentrasi (10 ⁹ / ml)	1,18 ± 0,08
spermatozoa hidup (%)	79,60 ± 3.85
Abnormalitas (%)	8,80 ± 1,79
Membran plasma utuh (%)	85,42 ± 1,78

Berdasarkan hasil penilaian semen segar pada tabel 1 di atas, 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. Hal ini sesuai dengan pernyataan Toelihere (1985) dan Balai Inseminasi Buatan Dirjen Peternakan bahwa terdapat beberapa persyaratan yang harus dipenuhi dalam proses pendinginan atau pembekuan semen sapi adalah perkiraan motilitas minimal 70%, konsentrasi lebih dari 800 juta per milliliter semen, persentase hidup spermatozoa minimal 75%, abnormalitas tidak lebih dari 20% dan semen memiliki gerakan massa ++/+++.

Hasil pengamatan rata-rata persentase MPU sapi aceh terhadap waktu ekuilibrasi yang berbeda-beda dengan pengenceran sitrat kuning telur setelah pembekuan dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata (± SD) persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah di ekuilibrasi dengan waktu yang berbeda-beda

Perlakuan	MPU Spermatozoa (%)
K1	34.52±4.59 ^c
K2	52.06±5.86 ^{ab}
K3	57.24±5.07 ^a
K4	48.22±3.70 ^b
K5	5.44±1.07 ^d

Ket: Superskrip huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P< 0.05).

Hasil *analysis of variance* (ANOVA) satu arah terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh menunjukkan ada perbedaan yang nyata (p<0,05) diantara kelompok perlakuan ekuilibrasi. Hasil ini membuktikan bahwa perlakuan ekuilibrasi berpengaruh terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan dengan media sitrat kuning telur.

Selanjutnya hasil analisis uji berganda Duncan menunjukkan bahwa rata-rata persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan ekuilibrasasi selama 4 jam (K3) berbeda secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan pada kelompok perlakuan ekuilibrasasi selama 2 jam (K1), selama 5 jam (K4) dan selama 6 jam (K5), namun tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan ekuilibrasasi selama 3 jam (K2). Rata-rata persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan K2 berbeda secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan K1 dan K5, namun tidak berbeda secara nyata ($P > 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan K4. Rata-rata persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan K4 berbeda secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan K1 dan K5. Rata-rata persentase MPU spermatozoa pada kelompok perlakuan K1 berbeda secara nyata ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan K5. Hasil ini membuktikan bahwa lama waktu ekuilibrasasi berpengaruh terhadap persentase MPU spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan dalam medium sitrat kuning telur. Lama waktu ekuilibrasasi 4 jam menghasilkan persentase MPU spermatozoa sapi aceh yang lebih baik dibandingkan dengan ekuilibrasasi selama 2 jam, 5 jam dan 6 jam, namun tidak berbeda dengan ekuilibrasasi selama 3 jam.

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) menyebutkan bahwa ekuilibrasasi 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 ekuilibrasasi panjang lebih sedikit bila dibandingkan dengan persentase MPU spermatozoa pada waktu ekuilibrasasi yang lebih pendek, hal ini disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kerusakan membran plasma sebagai 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 ekuilibrasasi yang tepat agar terjadi perlindungan yang optimal. Pada penelitian ini persentase MPU spermatozoa sapi aceh terbaik didapatkan pada waktu ekuilibrasasi 4 jam. Hal ini diduga karena waktu ekuilibrasasi 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 ekuilibrasasi 2 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 ekuilibrasasi 5 dan 6 jam, persentase MPU sedikit lebih rendah dibandingkan ekuilibrasasi 4 jam, hal ini diduga karena waktu ekuilibrasasi yang panjang akan merusak struktur membran. Pada waktu ekuilibrasasi gliserol akan memasuki sel-sel spermatozoa untuk menggantikan dari sebagian air yang ada di dalam sel, tetapi dengan waktu ekuilibrasasi 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 (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.

PENUTUP

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu ekuilibrasasi berpengaruh sangat nyata terhadap integritas membran plasma spermatozoa sapi aceh pasca pembekuan dengan media sitrat kuning telur. Waktu ekuilibrasasi 4 jam menghasilkan persentase MPU

spermatozoa yang lebih baik dibandingkan dengan waktu ekuilibrase 2 jam, 3 jam, 5 jam, dan 6 jam.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan tingkat keberhasilan pengaplikasian straw spermatozoa sapi aceh pasca pembekuan dengan media sitrat kuning telur ayam dengan waktu ekuilibrase yang berbeda-beda pada kegiatan inseminasi buatan pada induk betina birahi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N. 2008. Karakterisasi genetik sapi aceh menggunakan analisis keragaman fenotipik, daerah d-loop dna mitokondria dan dna mikrosatelit. *Thesis*. Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Aku, S. Achmad, B. Purwantara, dan R.M. Toelihere. 2007. Preservasi Semen Domba Garut (Ovaries) dalam berbagai Konsentrasi Bahan Pengencer Berbasis Lesitin Nabati. *Agribisnis plus* 17(1):45-47.
- Arifiantini, I., T.L. Yusuf, dan D. Yanti. 2005. Kaji banding kualitas semen beku sapi friesian holstein menggunakan pengencer dari berbagai balai inseminasi buatan di Indonesia. *Journal Animal Production*. 7(3): 168-176.
- Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang. 2011. *Buku Pintar Inseminasi Buatan*. Balai Inseminasi Buatan, lembang. Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Kementerian Pertanian.
- Fannessia, L.D., N.W.K. Karja, I.K.M. Adnyane dan M.A. Setiadi. 2015. Pelacakan kerusakan akrosom spermatozoa domba selama pembekuan dengan teknik histokimia lektin. *Jurnal Veteriner* 16(4): 560-568.
- Febriani, G.D., Hamdan dan J. Melia. 2014. Pengaruh waktu ekuilibrase terhadap kualitas semen kerbau lumpur (*Bubalus bubalus*) setelah thawing. *Jurnal Medika Veterinaria* 8(1) ISSN: 0853-1943.
- Gaspersz, V. 1991. *Metode Perancangan Percobaan*. Armico. Bandung.
- Hafez, E.S.E. 2004. *Semen Evaluation In Reproduction In Farm Animals*. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland, USA.
- Hanifi, H., M.N. Ihsan dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh lama ekuilibrase pada proses pembekuan terhadap kualitas semen wagyu menggunakan pengencer andromed. *Jurnal Ternak Tropika* 17(1): 31-41.
- Herdis. 2008. Metode pemberian gliserol dan lama ekuilibrase pada proses pembekuan semen kerbau lumpur. *Tesis*. Program Pascasarjana IPB Bogor.
- Isnawati., Tjandrakirana dan N. Ducha. 2016. Evaluasi bilangan MDA (Malondiadehid) sebagai indikator terjadinya perusakan integritas membran spermatozoa yang disimpan pada berbagai larutan pengencer. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*: 112-115.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas semen sapi simental yang dibekukan menggunakan krioprotektan gliserol. *Jurnal Agroland*. 16(2): 172-179.
- Muzakkir., Dasrul, S Wahyuni, M Akmal dan M. Sabri. 2017. Pengaruh lama ekuilibrase terhadap kualitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan menggunakan pengencer andromed®. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 5(2):115-128.
- 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 ekuilibrase terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. *Tesis*, Bogor. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.

Toelihere, M.R. 1985. *Inseminasi buatan pada ternak*, Angkasa, Bandung.

Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi buatan pada ternak*. Angkasa. Bandung.

Zulyazaini., Dasrul, S. Wahyuni, M. Akmal dan M.A.N. Abdullah. 2016. Karakteristik semen komposisi kimia plasma seminalis sapi Aceh yang dipelihara di BIBD Saree Aceh Besar. *Agribisnis Peternakan* 16(2): 121-130.