

**EFEK INTERAKSI MASA EKUILIBRASI DAN LAJU PENURUNAN SUHU TERHADAP
PENINGKATAN KEUTUHAN MEMBRAN PLASMA SPERMA
DOMBA PRIANGAN PASCA THAWING**

**(The Interaction Effect of Equilibration Time and Freezing Rate toward the Membran Plasma
Sperm Integrity of Priangan Ram Sperm Post thawing)**

Ken Ratu Gharizah Alhuur¹, Soeparna², dan Rd. Siti Darodjah²

¹Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran

²Departemen Produksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran

Jl. Raya Bandung-Sumedang Km.21, Jawa Barat 40600

Email : kenalhuur@gmail.com

ABSTRACT

In general, the freezing process of semen will have a detrimental effect on the structure and function of spermatozoa. The critical point in the semen freezing process is when the temperature drops to freezing, but this can be overcome by applying the right equilibration period. This study aimed to find out the best the equilibration length, the freezing rate, their interaction in the semen freezing process towards membrane sperm cell integrity of the frozen semen post thawing. This study used Priangan sheep's semen and was carried out according to a completely randomized design with a 3 x 3 split-plot design arrangement. The main plot was equilibration length, i.e., 0.5, 1.5, and 2.5 hours. The subplot was the freezing rate, i.e., 7.5°C/mins, 13.5°C/mins, and 19.5°C/mins. The result of the study showed that there was a significant interaction ($P < 0.05$) between the equilibration length of 1.5 hours and the freezing rate of 13.5°C/mins on the motility and the membrane sperm cell integrity. In conclusion, the best sperm quality was obtained from the equilibration length of 1.5 hours and the freezing rate of 13.5°C/mins.

Keyword : Membrane Sperm Cell Integrity, Equilibration Length, Freezing Rate.

ABSTRAK

Proses pembekuan semen pada umumnya akan memberikan efek merugikan pada struktur dan fungsi spermatozoa. Titik kritis pada proses pembekuan semen adalah pada saat penurunan suhu ke titik beku, namun hal ini dapat diatasi dengan penerapan masa ekuilibrasi yang tepat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama ekuilibrasi dan laju penurunan suhu terbaik serta interaksi antara keduanya dalam proses pembekuan sperma terhadap keutuhan membran plasma sperma dari semen beku pasca *thawing*. Penelitian ini menggunakan semen domba Priangan dan dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola 3 (petak utama) x 3 (anak petak). Sebagai petak utama (main plot) adalah lama waktu ekuilibrasi pada suhu 5°C yang terdiri atas 3 taraf, yakni: 0,5 jam, 1,5 jam, 2,5 jam. Sebagai anak petak (subplot) adalah laju penurunan suhu pembekuan dari suhu 5°C sampai -160°C yang terdiri atas 3 taraf, yakni 7,5°C/menit, 13,5°C/menit, 19,5°C/menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat interaksi yang nyata lebih tinggi ($p < 0,05$) antara perlakuan lama ekuilibrasi 1,5 jam dan laju penurunan suhu 13,5°C/menit terhadap keutuhan membran plasma sperma. Kualitas terbaik ditunjukkan pada interaksi antara perlakuan lama ekuilibrasi 1,5 jam dan laju penurunan suhu 13,5°C/menit.

Kata Kunci: Keutuhan membran plasma sperma, Lama ekuilibrasi, Laju penurunan suhu pembekuan

PENDAHULUAN

Salah satu cara untuk mengoptimalkan perkembangan populasi domba Priangan di Jawa Barat dapat dilakukan melalui inseminasi

buatan. Umumnya, semen yang digunakan dalam program inseminasi buatan adalah semen beku. Semen beku memungkinkan materi genetik pejantan unggul hasil seleksi disebarkan ke sejumlah ternak betina yang memiliki jarak

tempuh jauh, ataupun untuk digunakan pada waktu yang akan datang, sehingga dapat meningkatkan potensi genetik domba Priangan secara luas.

Kelemahan penggunaan semen beku dalam program inseminasi buatan pada domba adalah angka konsepsi induk betina yang dikawinkan secara buatan dengan menggunakan semen beku cenderung lebih rendah dibandingkan dengan semen segar, karena pada dasarnya, proses pembekuan dan thawing akan pada semen akan memberikan efek merugikan terhadap struktur dan fungsi spermatozoa (Suyono dkk., 2018).

Masalah utama yang terjadi selama proses pembuatan semen beku adalah terjadinya cekaman dingin pada sel sperma yang dibekukan yang menyebabkan kematian, pengeluaran air yang berlebihan dari dalam sel sperma, pembentukan kristal es, dan terjadinya penumpukan elektrolit-elektrolit dan bahan terlarut lainnya di dalam larutan atau di dalam sel, yang mengakibatkan terjadinya perubahan intraseluler. Kristal-kristal es di dalam atau di luar sel akan menyebabkan kerusakan sperma secara mekanik. Kematian sel sperma pasca *thawing* dipengaruhi oleh perubahan permeabilitas sel sperma yang disebabkan oleh larutnya selubung lipoprotein dinding sel sperma akibat konsentrasi elektrolit yang berlebih. (Minter and DeLiberto, 2005; Zelpina, *et al.*, 2012).

Penurunan kualitas sperma umumnya terjadi secara drastis setelah sperma mengalami pembekuan karena adanya *cold shock*, salah satunya ditandai dengan rusaknya membran plasma utuh yang biasanya diikuti dengan rusaknya tudung akrosom sperma, akibatnya enzim-enzim yang diperlukan selama proses fertilisasi keluar dari badan sel, sehingga terjadi kegagalan fertilisasi (Herdis, dan Darmawan, 2012).

Laju penurunan suhu dalam proses pembekuan semen merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas semen. Metode laju penurunan suhu didasari oleh suhu kritis sperma pada proses pembekuan. Suhu kritis sperma ini berkisar antara -10°C sampai -25°C , dan kerusakan terutama terjadi pada suhu -17°C akibat kenaikan konsentrasi elektrolit selama pembekuan, sementara sperma membeku pada suhu $0,53^{\circ}\text{C}$ (Byrne, *et al.*, 2000; Minter and DeLiberto, 2005; Srianto, dkk., 2012). Pada pembekuan semen yang menggunakan metode pembekuan lambat terjadi kerusakan sperma yang ditunjukkan dengan terjadinya

pengeluaran air dalam jumlah banyak untuk mencapai keseimbangan potensial kimiawi intra dan ekstraseluler, akibatnya sel mengalami dehidrasi, sehingga konsentrasi larutan meningkat dan spermatozoa menjadi rusak. Sedangkan bila sperma dibekukan dengan metode cepat, maka keseimbangan potensial akan terganggu dan pengeluaran panas menjadi tidak sempurna, sehingga bagian intraseluler membeku menjadi kristal es yang halus, proses pembekuan ini mengakibatkan sel tidak dapat mengeluarkan air dengan cepat sehingga kristal es yang terbentuk merusak integritas sel dan menyebabkan melemahnya daya gerak, bahkan sampai menyebabkan kematian sperma (Herdiawan, 2004).

Penerapan metode laju penurunan suhu sedang dalam proses pembekuan semen akan mencegah terjadinya cekaman dingin lanjutan yang dapat terjadi ketika sperma memasuki suhu kritis, dan penerapan lama ekuilibrase yang optimal memberi kesempatan bagi gliserol untuk berdifusi dengan baik sehingga memberikan perlindungan yang optimal bagi sperma dalam menghadapi cekaman dingin selama proses pembekuan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama ekuilibrase dan laju penurunan suhu terbaik serta interaksi antara keduanya dalam proses pembekuan sperma terhadap keutuhan membran plasma sperma dari semen beku pasca *thawing*.

MATERI DAN METODE

Penampungan semen

Semen domba Priangan ditampung dengan menggunakan vagina buatan. Semen berasal dari 3 ekor domba Priangan, yang masing-masing domba ditampung semennya sebanyak 3 kali. Penampungan semen yang berasal dari ternak yang sama dilakukan dengan jarak waktu minimal dua hari antara penampungan. Semen yang telah ditampung segera dievaluasi secara mikroskopis dan makroskopis. Semen yang memenuhi kriteria, dengan motilitas minimal 60-90 %, abnormalitas sperma kurang dari 15%, dan membran plasma utuh diatas 60% (Solihati, dkk., 2018) akan diproses lebih lanjut untuk proses pengenceran semen. Perhitungan volume pengencer yang dibutuhkan berdasarkan produksi dan kualitas semen yang didapat dengan rumus (Hanifi, dkk., 2016):

$$\frac{\text{vol. semen (ml)} \times 0,5 \times \text{motilitas individu} \times \text{konsentrasi semen (10}^6\text{)}}{35 \times 10^6}$$

Pengenceran dan pengemasan semen

Bahan pengencer yang digunakan adalah tris-kuning telur dengan perbandingan 4:1 (Novita dkk., 2019). Larutan tris-kuning telur ditambahkan dengan gliserol 7% dengan metode satu tahap (*one-step method*). Larutan tris-kuning telur yang mengandung gliserol 7% ditambahkan antibiotik 1 mg *streptomycin* dan 1000 IU penicillin setiap ml larutan pengencer (Herbowo, 2017). Semen yang memenuhi kelayakan setelah evaluasi makroskopis dan mikroskopisakan diproses dimasukkan ke dalam larutan Tris-kuning telur sesuai angka pengenceran yang didapatkan, dan dimasukkan ke dalam straw.

Ekuilibrasi dan pembekuan semen

Segera setelah proses *filling* dan *sealing*, straw berisi semen diletakkan dalam rak straw kemudian dimasukkan ke dalam *refrigerator* untuk menjalani proses penurunan suhu yang lambat dari suhu kamar 25°C ke 5°C selama 2 jam (Tuhu, *et al.*, 2013) dan selanjutnya diekuilibrasi pada suhu 5°C selama waktu yang dicobakan, yaitu 0,5 jam; 1,5 jam; dan 2,5 jam. Setelah diekuilibrasi, semen dalam straw dimasukkan ke dalam mesin ICE CUBE 14M untuk dibekukan dengan laju penurunan suhu yang dicobakan, yaitu 7,5°C/menit, 13,5°C/menit, dan 19,5°C/menit. Pengaturan laju penurunan suhu menggunakan program yang tersedia pada mesin pembekuan semen sampai suhu -160°C. Setelah semen dibekukan, semen beku terus diberi uap dengan N₂ cair sampai suhu -196°C dan dimasukkan ke dalam *container* penyimpan semen beku.

Evaluasi semen

Evaluasi semen dilakukan dalam periode empat waktu, yaitu pada keadaan semen segar, sebelum ekuilibrasi, setelah ekuilibrasi, dan pasca *thawing*. Evaluasi semen beku dilakukan setelah straw di *thawing* di dalam suhu 37°C selama 2 menit (Tuhu, *et al.*, 2013).

Variabel penelitian dan pengukurannya

Motilitas

Motilitas dievaluasi dengan mengamati pergerakan individu sperma dengan mikroskop binokuler perbesaran 400x, dan dihitung berdasarkan jumlah spermatozoa motil progresif dari satu lapangan pandang dan dihitung dalam persen (Hanifi, *et al.*, 2016).

Abnormalitas sperma

Hal yang diamati dalam evaluasi abnormalitas sperma ini meliputi abnormalitas kepala (terlalu kecil, terlalu besar, kepala dua pada satu ekor dan kepala terputus), dan abnormalitas ekor. Evaluasi dilakukan pada minimal 200 spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali (Herdis, 2015).

Keutuhan membran sperma

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah keutuhan membran sperma. Pengukuran dimulai dengan melarutkan 0,1 ml semen dengan 9,9 ml larutan *hypo-osmotik*, atau menggunakan metode *Hypo-Osmotik Swelling* atau *HOS test* (Dasrul dkk., 2012). Pengamatan dan perhitungan dilakukan terhadap sperma yang mengembung (M) dan tidak mengembung (TM) pada bagian ekornya. Sperma yang mengembung atau bengkok pada bagian ekornya menandakan membran sel sperma utuh, demikian sebaliknya (Arsiwan, 2014). Sperma yang diamati paling sedikit berjumlah 200 sel. Perhitungan berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Keutuhan membran} = \frac{M}{M+TM} \times 100\%$$

Rancangan percobaan dan analisis data

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental berdasarkan Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan pola 3 (petak utama) × 3 (anak petak). Sebagai petak utama (main plot) adalah lama waktu ekuilibrasi pada suhu 5°C yang terdiri atas 3 taraf, yakni: E_{0,5} = 0,5 jam, E_{1,5} = 1,5 jam, E_{2,5} = 2,5 jam. Sebagai anak petak (subplot) adalah laju penurunan suhu pembekuan dari suhu 5°C sampai -160°C yang terdiri atas 3 taraf, yakni: T_{7,5} = 7,5°C/menit, T_{13,5} = 13,5°C/menit, T_{19,5} = 19,5°C/menit. Hasil penelitian dianalisis statistik menggunakan sidik ragam, dan perhitungan tersebut diuji lanjut menggunakan uji Duncan, untuk melihat perbedaan antar perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik semen segar domba priangan

Berdasarkan hasil evaluasi semen segar domba Priangan yang ditampung menggunakan vagina buatan, diperoleh rata-rata karakteristik kualitas makroskopis dan mikroskopis semen segar domba Priangan (Tabel 1).

Tabel 1. Rataan evaluasi karakteristik semen segar domba Priangan

Parameter	Hasil penelitian	Penelitian terdahulu (Waluyo, 2005)
Volume (ml/ejakulat)	0,9	0,3 – 1,5 ml
Warna	Krem	Krem
Konsistensi	Kental	Kental
pH	7	6,8 – 7
Bau	Amis khas domba	Amis Khas domba
Gerakan Massa	+++	+++
Konsentrasi (juta/ml)	3100 juta/ml	2900 Juta/ml
Motilitas Sperma (%)	91,56%	82%
Abnormalitas Sperma (%)	4.22%	8%
Membran Plasma Utuh (%)	90.94%	77,2%
Tudung Akrosom Utuh (%)	89,3%	89,8%

Berdasarkan Tabel 1 karakteristik semen segar domba Priangan yang digunakan dan dinilai secara makroskopis dan mikroskopis tidak berbeda jauh dibandingkan karakteristik semen hasil penelitian Waluyo (2005). Konsentrasi dan motilitas sperma yang tinggi sangat berpotensi untuk diproses menjadi semen beku, karena dapat meningkatkan jumlah dosis IB yang dihasilkan dan kemungkinan motilitas sperma pasca pembekuan masih di atas ambang batas normal yang dapat digunakan untuk inseminasi, yaitu 60% (Solihati dkk., 2018), semen yang ditampung rata-rata menunjukkan motilitas 91,56%, dengan demikian semen tersebut layak untuk diproses lebih lanjut. Perolehan konsentrasi sperma yang tinggi pada domba Priangan yang digunakan dapat dipengaruhi oleh kondisi fisik ternak, seperti umur yang masih tergolong produktif, bobot badan yang optimal, kualitas pakan yang baik, dan frekuensi penampungan semen yang optimal.

Efek interaksi masa ekuilibrisasi dan laju penurunan suhu pembekuan terhadap keutuhan membran plasma sperma domba priangan

Hasil penelitian mengenai efek masa ekuilibrisasi dan laju penurunan suhu pembekuan terhadap membran plasma sperma domba Priangan berdasarkan analisa statistik tersebut diperoleh bahwa lama ekuilibrisasi dan laju penurunan suhu memberikan pengaruh nyata lebih baik ($P < 0,05$) dan mempunyai interaksi nyata lebih baik ($P < 0,05$) terhadap keutuhan membran plasma sperma domba Priangan pasca pembekuan. Terjadinya interaksi tersebut disebabkan lama ekuilibrisasi dan laju penurunan suhu mempunyai efek mempengaruhi satu sama lain terhadap keutuhan membran plasma sperma domba Priangan pasca pembekuan.

Keutuhan membran plasma sperma pada lama ekuilibrisasi 1,5 jam nyata lebih tinggi dibandingkan lama ekuilibrisasi 0,5 jam dan 2,5

Tabel 2. Rataan membran plasma sperma domba Priangan dengan berbagai interaksi masa ekuilibrisasi dan laju penurunan suhu pembekuan

Lama ekuilibrisasi (Jam)	Laju penurunan suhu ($^{\circ}\text{C}/\text{menit}$)			Rataan
	7,5	13,5	19,5	
0,5	36,17% ^{Aa}	43,00% ^{Ac}	39,00% ^{Ab}	39,39%
1,5	40,83% ^{Ca}	50,33% ^{Cc}	42,33% ^{Cb}	44,50%
2,5	39,8% ^{3Ba}	44,50% ^{Bc}	40,33% ^{Bb}	41,56%
Rataan	38,94%	45,94%	40,56%	

Ket: * Huruf kecil yang berbeda kearah baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

* Huruf capital yang berbeda kearah kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

jam, dan perlakuan lama ekuilibrisasi 2,5 jam menunjukkan keutuhan membran plasma yang lebih baik dibandingkan hasil lama ekuilibrisasi 0,5 jam. Keutuhan membran plasma sperma pada perlakuan laju penurunan suhu pembekuan 13,5°C/menit menunjukkan hasil yang nyata lebih tinggi dibandingkan laju penurunan suhu 7,5°C/menit dan 19,5°C/menit, dan perlakuan laju pembekuan 19,5°C/menit menunjukkan keutuhan membran plasma yang lebih tinggi dibandingkan laju penurunan suhu 7,5°C/menit.

Berdasarkan hasil yang disajikan pada Tabel 2, lama ekuilibrisasi 1,5 jam menghasilkan rata-rata keutuhan membran plasma yang lebih tinggi yaitu 44,50 %, dibandingkan lama ekuilibrisasi 0,5 jam dan 1,5 jam yaitu sebesar 39,39 dan 41,56 %. Laju pembekuan 13,5°C/menit menunjukkan rata-rata keutuhan membran plasma sperma yang lebih baik, yaitu sebesar 45,94 %, dibandingkan dengan laju pembekuan 7,5°C/menit dan 19,5°C/menit yang secara berturut-turut yaitu 38,94 dan 40,56 %.

Tingginya kerusakan membran sel sperma pada ekuilibrisasi 0,5 jam disebabkan tidak terjadi proteksi sperma yang optimal oleh gliserol terhadap cekaman dingin, akibat gliserol belum menyerap secara optimal ke dalam sel sperma. Hal ini mengakibatkan konsentrasi intraseluler sperma menjadi tidak seimbang, akibatnya kadar air dalam sel sperma meningkat dan pada proses pembekuan terbentuk kristal-kristal es yang dapat merusak selubung lipoprotein dinding sel sperma (Azizah dan Arifiantini, 2009). Kerusakan membran plasma sperma yang terjadi pada lama ekuilibrisasi 2,5 jam diakibatkan penumpukan asam laktat dan zat-zat sisa metabolisme yang berakibat toksik bagi sperma, dan terbentuknya peroksida lipid menyebabkan kerusakan struktur membran sperma (Suherman, 2016). Penumpukan konsentrasi asam laktat yang tinggi tersebut dapat berpengaruh pada tekanan osmotik larutan. Sesuai dengan yang disampaikan oleh Tuhi dkk. (2013), bahwa peningkatan tekanan osmotik pada plasma semen mengakibatkan penurunan permeabilitas membran sperma dan mengakibatkan peningkatan kerusakan membran. Masa ekuilibrisasi yang terlalu lama juga menyebabkan zat radikal bebas yang berasal dari metabolisme sperma menumpuk di dalam larutan semen, sementara fosfolipid membran sel sperma domba sangat rentan terhadap serangan radikal bebas (Solihati dkk., 2018).

Kerusakan membran sel sperma yang terjadi pada laju penurunan suhu pembekuan lambat -7,5°C/menit disebabkan terjadi dehidrasi akibat konsentrasi intraseluler yang berlebihan dan menimbulkan perubahan osmotik selama pembekuan. Perbedaan konsentrasi intraseluler yang berlebihan ini dapat melarutkan selubung lipoprotein sperma sehingga membran sel sperma mengalami kerusakan. Laju penurunan suhu pembekuan yang terlalu cepat juga akan memberikan efek merugikan bagi sperma. Sel sperma yang mengalami laju penurunan suhu pembekuan cepat akan mengeluarkan air yang sedikit dan belum mencapai keadaan yang ekuilibrium, sehingga ketika mencapai titik beku, sisa air di dalam sel sperma tersebut berubah menjadi kristal-kristal es intraseluler. Kristal es intraseluler yang terbentuk pada pembekuan cepat -19,5°C/menit, menekan membran sel sehingga terjadi kerusakan mekanis berupa pecahnya membran sel dan substansi kimia dalam sel sperma keluar (Muzakkir dkk., 2017).

KESIMPULAN

Terdapat interaksi antara perlakuan lama ekuilibrisasi 1,5 jam dan laju penurunan suhu 13,5°C/menit terhadap keutuhan membran plasma sperma Domba Priangan pasca *thawing*. Tingkat perlakuan lama ekuilibrisasi 1,5 jam memberikan respon yang baik terhadap keutuhan membran plasma, dan tingkat perlakuan laju penurunan suhu 13,5°C/menit memberikan respon terbaik terhadap keutuhan membran plasma sperma domba Priangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arsiwan, A., T. Saili, dan S. Rahadi. 2014. Membran plasma utuh spermatozoa epididimis kambing peranakan etawa dalam natrium klorida dengan konsentrasi berbeda. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Peternakan Tropis*, 1(1): 79-87.
- Azizah dan R. I. Arifiantini. 2009. Kualitas semen beku kuda pada pengencer susu skim dengan konsentrasi gliserol yang berbeda. *Jurnal Veteriner*, 10(2): 63 -69.
- Byrne, G.P., P. Lonergan, M. Wade, P. Duffy, A. Donovan, J. P. Hanrahan, and M. P. Bloand. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 62: 265 - 275.

- Dasrul, D., R. Rasmaidar, dan A. Harris. 2012. Efektivitas penambahan vitamin E (*alfatokoferol*) dalam medium pencucian sperma dengan sentrifugasi terhadap kualitas spermatozoa sapi Brahman. *Agripet*, 12(2): 7-13.
- Hanifi, H., M. N. Ihsan, dan T. Susilawati. 2016. Pengaruh lama ekuilibrasasi pada proses pembekuan terhadap kualitas semen sapi wagyu menggunakan pengencer Andromed®. *J. Ternak Tropika*, 17(1): 31-41.
- Herbowo, M. T. 2017. Kriopreservasi Semen Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) dalam Pengencer Tris atau Skim Kuning Telur dengan Krioprotektan Gliserol atau Dimetilformamida. Thesis. Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor
- Herdiawan, I. 2004. Pengaruh laju penurunan suhu dan jenis pengencer terhadap kualitas semen beku domba priangan. *JITV*, 9(2): 98 - 104.
- Herdis, D. 2012. Pengaruh maltosa sebagai krioprotektan ekstraselluler dalam meningkatkan kualitas semen beku guna mendukung keberhasilan teknologi inseminasi buatan. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*, 14(3): 197 - 201.
- Herdis, D. 2015. Daya motil dan keutuhan membran plasma spermatozoa domba Garut (*Ovis aries*) pada penambahan kolesterol dalam pengencer semen tris kuning telur. *JSTI*, 17(1):18.
- Minter, L. J., and T. J. DeLiberto. 2005. Influence of extender, freezing rate, and thawing rate on post-thaw motility, viability and morphology of Coyote (*Canis latrans*) spermatozoa. *Theriogenology*, 64: 1898-1912.
- Muzzakir, D., S. Wahyuni, M. Akmal, dan M. Sabri. 2017. Pengaruh lama ekuilibrasasi terhadap kualitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan menggunakan pengencer Andromed®. *Jurnal Ilmiah Peternakan*, 5(2): 115-128.
- Nur, Z., Z. Berrin, U. Buren, T. Serife, S. Hakan, C. G. Ozguden, G. Ulgen, and D. Ibrahim. 2011. Effect of freezing rate on acrosome and chromatin integrity in ram semen. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 58: 267-272.
- Novita R., T. Karyono, dan Rasminah. 2019. Kualitas semen sapi Brahman pada presentase tris kuning telur yang berbeda. *Jurnal Sains Peternakan Indonesia*, 14(4): 351-358.
- Solihati, N., S. D. Rasad, R. Setiawan, dan S. Nurjanah. 2018. Pengaruh kadar gliserol terhadap kualitas semen domba lokal. *Jurnal Biodjati* 3(1): 63-71.
- Srianto, P., S. Trilas, dan M. Pantja. 2012. Peningkatan Kualitas Semen Beku Melalui Perbaikan Kualitas Diluter. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Suherman, H. 2017. Kualitas semen beku domba garut (*Ovis aries*) pada penambahan sukrosa dalam pengencer semen tris kuning telur. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati*, 16(1):31-38.
- Tuhu A. D., Y. S. Ondho, dan D. Samsudewa. 2013. Pengaruh perbedaan waktu pelepasan water jacket dalam proses ekuilibrasasi terhadap kualitas semen beku sapi jawa pada tahap *before freezing* dan *post thawing*. *Jurnal Animal Agricultural*, 2(1): 473.
- Waluyo, S. T. 2005. Pengaruh Penggunaan Prolin dalam Pengencer Susu Skim pada Sperma Beku Terhadap Kualitas Sperma Domba Priangan. Balai Besar Diklat Agribisnis Peternakan dan Kesehatan Cinagara, Bogor. Hal. 22-25.
- Zelpina E., B. Rosadi, dan T. Sumarsono. 2012. Kualitas spermatozoa post thawing dari semen beku sapi perah. *Jurnal Ilmu-ilmu Peternakan*, 15(2): 94-102.