

Pengaruh Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Bali, Sapi Madura dan Sapi PO

(Effect of thawing technique to quality frozen semen spermatozoa in Bali, Madura and PO cattle)

Muhammad Ade Salim¹, Trinil Susilawati² dan Sri Wahyuningsih²

¹ Program Studi Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Khairun, Ternate

² Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.

ABSTRACT The experiment was conducted from November 2011 to January 2012 in BBIB Singosari. The study aims was to determine the effect of thawing techniques on the quality frozen bovine sperm Bali, Madura and PO cattle. This material used 90 frozen straw of three cattle from the three breed. The method is an experiment with three treatments and 10 replications for frozen to thawing in temperature water is 5°C of duration 60 seconds, 15°C duration 30 seconds and 37°C duration 15 seconds. Variables observed in this study were sperm quality are motility, viability and abnormality. Data in percentage transformed in to arcus sinus were analyzed using Completely

Randomized Block Design (CRBD) with replication as blocks of 10x. The results showed the thawing at 37°C duration 15 seconds to highly significant effect ($P < 0,01$) viability and motility and significant effect ($P < 0,05$). The abnormalities, no significant effect ($P > 0,05$). Breed cattle not significant effect to quality. It can be concluded that thawing techniques impact the motility and viability in frozen bovine semen spermatozoa Bali, Madura and PO cattle. Thawing using 37°C temperature water with duration of 15 seconds is the best method to obtain the quality of spermatozoa post thawing frozen sperm.

Key words : thawing technique, sperm quality.

2012 Agripet : Vol (12) No. 2: 14-19

PENDAHULUAN

Sapi Bali, Madura dan PO merupakan sapi lokal sebagai potensi peternakan nasional perlu diberdayakan sehingga berkontribusi dalam penyediaan daging nasional. Upaya perbaikan mutu genetik ternak sapi Bali, Madura dan PO sebagai potensi sumber daya lokal di sektor peternakan perlu dilakukan dengan tujuan untuk perbaikan kualitas produksi dan kelestarian genetik. Salah satu cara ke arah itu adalah melalui introduksi teknologi IB dengan semen beku ke tiga bangsa sapi tersebut. Namun seringkali terjadi gagal kebuntingan disebabkan rendahnya kualitas semen beku *post thawing*. Indikator rendahnya kualitas semen beku *post thawing* antara lain rendahnya motilitas massa ataupun individu, rendahnya angka viabilitas dan tingginya angka abnormalitas. Hal ini disebabkan salah satunya *handling* semen beku seperti *thawing*. *Thawing* dimaksudkan untuk mencairkan kembali semen beku dengan menggunakan media dan durasi tertentu

sehingga dapat dideposisikan ke alat reproduksi betina. Kondisi ini menimbulkan *heat shock effect* maupun kontaminasi dengan oksigen pada spermatozoa sehingga mempengaruhi kestabilan membran yang berdampak pada kualitas semen beku. Rodriguez, *et al.*, (2005), melaporkan bahwa proses *thawing* pada semen beku sapi dengan suhu 37°C selama 60 detik menyebabkan terjadinya beberapa kerusakan pada membran spermatozoa. Sedangkan Ansari *et al.*, (2010) melaporkan motilitas, viabilitas dan integritas membran tertinggi yaitu *thawing* pada air bersuhu 37°C selama 30 detik. Pesch and Hoffmann (2007), menyarankan untuk keperluan IB komersil pada sapi, sebaiknya *thawing* dilakukan pada air bersuhu 37°C selama 20 detik karena lebih praktis serta semen beku tidak boleh dithawing di bawah suhu 15°C. Perbedaan kualitas semen beku *post thawing* tersebut menunjukkan bahwa *thawing* pada suhu dan durasi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda pula pada kualitas semen beku *post thawing* Bangsa dan spesies ternak yang berbeda menghasilkan kualitas semen yang berbeda pula. Kondisi ini

Corresponding author : adesalim@yahoo.com

diduga mempengaruhi daya tahan spermatozoa pada semen beku yang telah mengalami proses *thawing*. Chandolia *et al.*, (1999) menjelaskan bahwa faktor genetik mempengaruhi ketahanan spermatozoa terhadap *heat shock* pada saat *thawing*. Sedangkan Brito *et al.*, (2002) melaporkan motilitas antar genotip sapi tidak berbeda nyata.

Bervariasinya kualitas semen beku *post thawing* pada berbagai bangsa sapi tersebut, menunjukkan belum adanya suatu teknik *thawing* yang dapat memberikan hasil yang optimal bagi tercapainya fertilisasi dengan semen beku sapi. Oleh karena itu kemampuan memformulasikan teknik *thawing* melalui variasi suhu dan durasi sangat menentukan kualitas spermatozoa semen beku *post thawing*.

Berdasarkan pemikiran inilah, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh teknik *thawing* terhadap kualitas spermatozoa semen beku sapi Bali, Madura dan Peranakan Ongole. Penelitian ini bertujuan untuk : 1). Mengetahui pengaruh teknik *thawing* terhadap kualitas spermatozoa *post thawing*, 2). Mengetahui pengaruh perbedaan bangsa sapi terhadap kualitas spermatozoa *post thawing*, 3). Mengetahui kualitas spermatozoa terbaik *post thawing*.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium BBIB Singosari Malang, selama 1 Bulan (November 2011 – Desember 2011).

Materi dan Metode

Penelitian ini menggunakan 90 straw semen beku dari sapi Bali, sapi Madura dan sapi PO yang diperoleh dari BBIB Singosari Malang. Bahan dan peralatan yang digunakan diantaranya air ledeng, eosin-negrosin, mikroskop cahaya, hand tally counter, container mini 3 liter. Perlakuan yang diberikan antara lain : P1. Thawing pada air bersuhu 5°C berdurasi 60 detik ; P2. Thawing pada air bersuhu 15°C berdurasi 30 detik dan P3. Thawing pada air bersuhu 37°C berdurasi 15 detik.

Variabel yang diamati meliputi : motilitas individu, viabilitas dan abnormalitas. Data hasil penelitian yang berupa persentase ditransformasi ke *arcus sinus* kemudian di

analisis menggunakan analisis ragam dengan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 10×ulangan sebagai Blok. Apabila hasil tersebut menunjukkan perbedaan, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1.Motilitas Individu

Hasil pengamatan pada motilitas individu *post thawing* spermatozoa semen beku ketiga bangsa sapi tertera pada Tabel 1.

Tabel 1: Rataan Persentase Motilitas Individu pada Berbagai Tingkat Perlakuan di Ketiga Bangsa Sapi (%)

Bangsa	P e r l a k u a n		
	I	II	III
Sapi Bali	34 ±5,67 ^a	34 ±9,07 ^a	42 ±2,42 ^b
Sapi Madura	37 ±5,7 ^a	40 ±2,84 ^a	44 ±5,16 ^b
Sapi PO	31 ±4,60 ^a	39 ±8,84 ^b	40 ±8,32 ^b

Keterangan: Notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Hasil analisis ragam menunjukkan suhu dan durasi *thawing* memberikan pengaruh yang nyata (P<0,05) terhadap motilitas spermatozoa semen beku. Hasil uji BNT menunjukkan persentase motilitas terbaik yaitu pada perlakuan ke tiga dengan suhu *thawing* 37° C dan durasi 15 detik di semua bangsa sapi. Hasil ini tidak berbeda jauh dengan penelitian Pratiwi *et al.*,(2009) yang melaporkan *Post Thawing Motility* (PTM) tertinggi pada semen sapi Limousin dan Brahman pada perlakuan lama *thawing* air ledeng PDAM selama 0 menit masing – masing sebesar 41,5% dan 40,0%. Begitupun laporan penelitian Tambing *et al.*, (2000) yang melaporkan *thawing* pada suhu 37°C berdurasi 15 detik pada kerbau memberikan angka persentase motilitas individu sebesar 40%. Kondisi ini disebabkan karena pada P3 suhu *thawing* sesuai dengan temperatur ideal bagi aktivitas motilitas spermatozoa. Selain itu terjadi proses percepatan difusi gliserol intraseluler sekaligus mencegah terjadinya tekanan osmotik. Saat pembekuan dan *thawing* semen, terjadi peristiwa tekanan osmotik pada spermatozoa sehingga menyebabkan konfigurasi lipid protein membran spermatozoa menjadi tidak

seimbang, kemudian mempengaruhi keseimbangan osmotik. Selanjutnya terlihat persentase motilitas individu cenderung mengalami penurunan pada P2 dan P1 pada teknik *thawing* dengan suhu 15°C berdurasi 30 detik dan teknik *thawing* dengan suhu 5°C berdurasi 60 detik. Ini menunjukkan bahwa bila suhu *thawing* semakin rendah dan durasi *thawing* yang panjang menyebabkan terjadi penurunan daya motilitas individu. Chairasat *et al.*,(2006), melaporkan terjadi penurunan spermatozoa motil progresif seiring berkurangnya suhu *thawing* seperti penelitiannya pada semen beku sapi diperoleh hasil *thawing* pada suhu 37°C durasi 30 detik yaitu 51,04%, 30°C durasi 30 detik yaitu 40,41%, 25°C durasi 30 detik yaitu 39,79%, dan suhu telapak tangan durasi 30 detik yaitu 10 %. Samsudewa dan Suryawijaya (2008) juga melaporkan bahwa durasi *thawing* yang terlalu lama, maka terjadi penurunan motilitas individu sampai pada kualitas yang tidak bisa dipakai lagi untuk IB (<40%) yaitu pada *thawing* dengan air es selama 30 menit dan 60 menit masing-masing 37,50±1,8% dan 25,00±1,82% pada sapi Simental dan 40,00±1,64% dan 20,00±1,14% pada sapi Limousin. Hal ini disebabkan karena pada P2 dan P1 suhu *thawing* terlalu rendah, yang tidak sesuai dengan kondisi fisiologis pergerakan spermatozoa, sehingga daya gerak spermatozoa rendah. Menurut Watson (1996) menjelaskan temperatur rendah juga akan mengakibatkan struktur fosfolipid membran plasma akan berubah dari fase cair menjadi fase gel. Selain itu durasi *thawing* yang terlalu lama menyebabkan aktivitas metabolisme meningkat dan berlangsung secara massal, terjadi peningkatan produksi asam laktat sehingga konsentrasi asam laktat yang bersifat *toxic* meningkat berakibat pada rendahnya daya gerak spermatozoa sampai terjadi kematian. Menurut Datta *et al.*,(2009), spermatozoa yang terlalu lamaterpapar oksigen menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas yang menghasilkan peroksidasi lipid, sebagai faktor penyebab kerusakan membran spermatozoa. Peningkatan radikal bebas berupa spesies oksigen reaktif (ROS) dapat merusak struktur membran mitokondria spermatozoa sehingga menginduksi terjadinya apoptosis yaitu kematian sel secara fisiologis karena adanya perubahan morfologi maupun biokimia sel.

Mitokondria sebagai organel spermatozoa yang berada pada bagian ekor spermatozoa, jika membrannya kehilangan fungsi potensialnya, maka kemampuan untuk mensintesis ATP sebagai sumber energi menurun. ATP dan ATP-ase membentuk suatu matarantai antara reaksi-reaksi yang menghasilkan energi dan motilitas. Terdapat korelasi antara jumlah ATP di dalam sperma dengan motilitasnya (Toelihere,1981).

Hasil rata-rata analisis menunjukkan bahwa rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah perlakuan terbaik pada sapi Madura di setiap perlakuan. Hal ini disebabkan sapi Madura memiliki keunggulan dari sisi genetik dengan produksi semen yang memiliki kualitas yang baik. Chandolia *et al.*, (1999) menyatakan genetik juga mempunyai peran dalam daya tahan spermatozoa dari pengaruh kejutan panas pada saat proses *thawing*. Selain itu dari sisi libido, kemampuan libido sapi Madura berpengaruh terhadap kualitas dan daya tahan semen sapi Madura, karena libido terkait dengan kecepatan ejakulasi. Jika libidonya besar maka proses ejakulasi bisa berlangsung dengan cepat, sehingga semen tidak terpapar oksigen. Libido ditandai dengan pejantan mendekati betina dan mulai dinaiki. Libido yang besar ditandai dengan cepatnya proses menaiki sampai ejakulasi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Herwijanti *et al.*,(2004) yang melaporkan bahwa Sapi Madura dengan libido yang cepat 21,47 detik, memiliki daya motilitas sebesar 71,67% dibandingkan dengan sapi Bali yang memiliki libido 60,87 detik memiliki daya motilitas sebesar 67,33%. Besarnya libido ternak dipengaruhi oleh peningkatan produksi testoteron. Menurut Hafez, Jaenudin and Rosnina(2008), menyatakan dalam fungsinya testoteron mengatur tingkah laku seksual pejantan dan proses pengembangan spermatogenesis serta aktivitas sekresi kelenjar asesoris.

2. Viabilitas

Hasil pengamatan pada viabilitas *post thawing* spermatozoa semen beku ketiga bangsa sapi tertera pada Tabel 2.

Tabel 2: Rataan Persentase Viabilitas pada Berbagai Tingkat Perlakuan di Ketiga Bangsa Sapi (%)

Sapi	P e r l a k u a n		
	I	II	III
Sapi Bali	61,85 ± 0,30 ^c	60,10 ± 0,30 ^a	86,20 ± 0,06 ^b
Sapi Madura	65,20 ± 0,26 ^c	77,55 ± 0,18 ^{ab}	91,40 ± 0,02 ^b
Sapi PO	37,85 ± 0,08 ^a	75,10 ± 0,27 ^b	77,80 ± 0,25 ^b

Keterangan: Notasi yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Pada Tabel 2 menunjukkan suhu dan durasi *thawing* memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap viabilitas spermatozoa semen beku. Hasil uji BNT menunjukkan angka persentase viabilitas terbaik pada perlakuan ke tiga dengan suhu *thawing* 37° C dan durasi 15 detik pada setiap bangsa sapi. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa P3 memberikan rata-rata persentase viabilitas tertinggi pada spermatozoa. Kondisi ini disebabkan P3 dengan *thawing* pada air bersuhu 37°C berdurasi 15 detik belum menyebabkan terjadinya tekanan osmotik secara ekstrim pada membran spermatozoa, sehingga permiabilitas membran utuh dan tidak terganggu, ini menjamin fluiditas dan keseimbangan homeostatis membran sel karena pertukaran senyawa-senyawa berlangsung secara normal. Selain itu durasi *thawing* yang singkat belum menyebabkan terjadinya peningkatan aktivitas metabolisme spermatozoa yang berakibat menurunkan daya tahan hidup. Peningkatan aktivitas metabolisme menghasilkan asam lemak dalam konsentrasi yang tinggi akibat peroksidasi lipid. Membran spermatozoa tersusun dari protein lipid, dan karbohidrat yang tersusun secara nonkovalen dan sangat sensitif terhadap faktor-faktor ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionik dan polaritas pelarut (Park and Graham, 1992). Fosfolipid merupakan komponen utama lipid membran spermatozoa yang secara struktural tersusun membentuk lapisan berganda. Kedua lapisan tersebut adalah fosfolipid hidrofilik dan fosfolipid hidrofobik. Fosfolipid hidrofilik membentuk permukaan membran bagian luar dan fosfolipid hidrofobik membentuk membran bagian dalam (Darnel *et al.*, 1990). Jika terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler, maka permiabilitas fosfolipid hidrofilik rusak

menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa. Ditambahkan Datta *et al.*, (2009), *Lipidperoxidasi* (LPO) dan kerusakan membran spermatozoa disebabkan karena selama proses *thawing* terbentuk radikal bebas metabolit oksigen yang bersifat toxic pada tingkatan yang rendah di dalam sel spermatozoa bersamaan dengan suplai oksigen yang terbatas, bersamaan pula dengan produksi radikal bebas pada pemulihan oksigen yang dipasok ke sel. Hal ini menimbulkan spekulasi bahwa peningkatan mendadak dalam pemanfaatan oksigen oleh spermatozoa menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas, sehingga terjadi peningkatan *lipidperoxidasi* sebagai faktor penyebab kerusakan membran spermatozoa. Ansari *et al.*, (2010) melaporkan bahwa terjadi penurunan pada persentase viabilitas semen beku kerbau Ravi Nilli pada *thawing* yang durasinya semakin panjang dimana viabilitas tertinggi yaitu pada durasi *thawing* 30 detik pada air bersuhu 37°C sebesar 79,3% dan menurun menjadi 77,0% pada durasi *thawing* 60 detik pada air bersuhu 37°C. Suhu *thawing* dan durasi yang tidak sesuai mengakibatkan membran spermatozoa mengalami kerusakan sebagai akibat cekaman panas dan kontak dengan oksigen. Membran spermatozoa yang tersusun dari fosfolipid mengalami reduksi karena timbulnya asam lemak dari proses peroksidasi sel.

Hasil rata-rata analisis juga menunjukkan bahwa rata-rata persentase viabilitas spermatozoa setelah perlakuan terbaik pada sapi Madura di setiap perlakuan. Hal ini disebabkan karena dari sisi genetik, spermatozoa sapi Madura memiliki daya tahan yang baik dari pengaruh perubahan suhu pada saat *thawing*. Hasil penelitian Herwijanti dkk (2004) yang melaporkan kemampuan libido sapi Madura berkorelasi positif dengan kualitas spermatozoa karena terkait dengan daya tahan hidup spermatozoa.

3. Abnormalitas

Hasil pengamatan abnormalitas *post thawing* spermatozoa semen beku ketiga bangsa sapi tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Persentase Abnormalitas pada Berbagai Tingkat Perlakuan pada Ketiga Bangsa Sapi (%)

Sapi	P e r l a k u a n		
	I	II	III
Sapi Bali	2,55 ±0,02	3,2 ±0,03	1,85 ±0,02
Sapi Madura	2,70 ±0,01	4,25 ±0,07	1,5 ±0,007
Sapi PO	5,75 ±0,05	7,75 ±0,09	3,5 ±0,02

Hasil analisis statistik pada Tabel 3 menunjukkan perlakuan tidak memberikan pengaruh terhadap persentase abnormalitas spermatozoa. Hasil pengamatan menunjukkan abnormalitas dari tiga perlakuan diperoleh angka persentase abnormalitas spermatozoa semen beku kurang dari 10% atau persentase spermatozoa normal masih di atas 90 % pada ke tiga jenis perlakuan. Hasil ini sudah sesuai dengan pendapat Toelihere (1981) dan Anonimous (2005) serta SNI Semen Beku Nasional (2005) yang merekomendasikan abnormalitas di bawah 20%, masih layak dipakai untuk IB. Hal ini mengindikasikan bahwa suhu dan lama *thawing* pada semua perlakuan belum banyak menyebabkan spermatozoa menjadi abnormal. Penyebabnya karena pada suhu dan durasi *thawing* pada semua perlakuan belum memberikan tekanan yang ekstrim secara mekanis sehingga spermatozoa menjadi abnormal seperti halnya ciri khas suatu spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier. Salah satu ciri spermatozoa yang mengalami abnormalitas tersier yaitu ekor atau kepalanya yang terputus. Sesuai hasil pengamatan kebanyakan abnormalitas yang terjadi yaitu spermatozoa yang ekor atau kepalanya terputus atau patah. Namun kondisi ini bukan disebabkan karena *thawing*, melainkan diduga karena proses preparasi seperti pembuatan preparat ulas. Yulnawati dkk., (2009) melaporkan abnormalitas tersier terjadi kemungkinan karena pembuatan preparat ulas yang menyebabkan kepala atau ekor spermatozoa putus.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa bangsa sapi tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa. Hasil ini menunjukkan bahwa spermatozoa ke tiga bangsa sapi tidak terpengaruh dengan adanya perlakuan *thawing*, tetapi abnormalitas yang terjadi diduga disebabkan karena adanya kesalahan dalam

preparasi ataupun ejakulasi. Arifiantini dkk., (2006) menjelaskan bahwa abnormalitas sekunder kemungkinan disebabkan karena kesalahan dalam preparasi atau ejakulasi., sedangkan Barth and Oko (1989), menjelaskan bahwa abnormalitas pada ekor disebabkan karena ejakulasi yang tidak sempurna dan *shock* terhadap suhu.

KESIMPULAN

1. Teknik *thawing* memberikan pengaruh terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa semen beku sapi Bali, sapi Madura dan sapi PO, dengan suhu *thawing* 37°C dan durasi 15 detik yang memiliki kualitas terbaik di setiap bangsa dengan rata-rata angka motilitas dan viabilitas tertinggi pada sapi Madura yaitu masing-masing 44%±5,16 dan 91,40%±0,02. Sedangkan abnormalitas perlakuan tidak berpengaruh.
2. Bangsa Sapi memberikan pengaruh terhadap kualitas spermatozoa semen beku *post thawing* dengan sapi Madura memiliki kualitas terbaik, dengan tingkat motilitas dan viabilitas terbaik yaitu pada tehnik *thawing* dengan air bersuhu 37°C berdurasi 15 detik. Sedangkan abnormalitas, bangsa sapi tidak berpengaruh.
3. Tehnik *thawing* terbaik yaitu pada *thawing* menggunakan air bersuhu 37°C dengan durasi 15 detik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kepada BBIB Singosari yang telah memberikan fasilitas penelitian dan layanan bantuan teknis selama penelitian serta semua pihak yang telah membantu.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2005. Standar Nasional Indonesia Semen Beku Sapi. Badan Standar Nasional ICS. 65.020. 30.
- Arifiantini, R. I., Wresdiyati, T dan Retnani, E. F. 2006. Pengujian Morfologi Spermatozoa Sapi Bali (*Bos sondaicus*) Menggunakan Pewarnaan "Williams". J. Indontrop. Anim. Agric. 31 (2) : 105 -110.

- Barth, A. D and Oko, R. J. 1989. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press. Iowa.
- Brito, L. F. C., Silva, A. E. D. F., Rodriguez, L. H., Vieira, V. F., Deragon L. A. G and Kastelic, J. P. 2002. Effects of Environmental Factors. Age and Genotype on Sperm Production and Semen Quality in Bos indicus and Bos taurus AI Bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science* 70 : 181-190.
- Chandolia, R. K., Reinertsen E. M and Hansen, P. J., 1999. Lack of Breed Differences in Responses of Bovine Spermatozoa to Heat Shock. *Short Communication. Journal Dairy Sci.* 82 : 2617 – 2619.
- Chaiprasat, S., Benjakul, W., Chartchue, A., Joemplang, P and Punyapornwithaya, V., 2006. Effect of Bull Semen Thawing Methods on Sperm Progressive Motility. *Chiang Mai Veterinary Journal* 4 (1) : 25 – 29.
- Darnel, J., Lodish, H and Baltimore, D., 1990. *Molecular Cell Biology*. 2th ed. Sci. Am. Book.
- Datta, U., Sekar, M. C., Hembram, M. L., Dasgupta, R., 2009. Development of a New Methode to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10° C. *Proceedings. Departement of Veterinary Gynaecology & Obstetrics Faculty of Veterinary and Animal Sciences West Bengal University of Animal and Fishery Sciences. Kolkata West Bengal. India.*
- Hafez E. S. E., Jenudin. and Rosnina. 2008. Hormones, Growth Factors and Reproduction. Chapter 3 Reproduction in Farm Animals 7th Edition. Balckwell. Publisishing : 33 – 54.
- Herwijanti, E., Susilawati. T dan Hakim. L., 2004. Pengaruh Tingkah Laku Seksual terhadap Kualitas Semen pada Berbagai Bangsa Sapi Potong. Thesis Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- Parks. J. E and Graham. J. K., 1992. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes. *Theriogenology*. 30. 209-22.
- Pratiwi, WC., Affandhy, L dan Ratnawati, D. 2009. Pengaruh Lama Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limousin dan Brahman. *J. Of Animal Production (JAP)*. Vol. 11 No. 1 : 48 – 52.
- Rodriguez, F. A – Almeida, M., Cuadras, A., Anchondo, S., Romo – Garcia, B. E., Sanchez, J. A., Jimenez, A. D., Alarcon - Rojo. 2005. Heparin Level Effect on Sperm Capacitation of Fresh an Frozen - Thawed Bovine Semen. *Proceedings Vol. 56 . Western Section. American Society of Animal Science. Mexyco City.*
- Samsudewa. D dan Suryawijaya., A. 2008. Pengaruh Berbagai Methode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Sapi. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Tambing, S. N dan Toelihere, M. R dan Yusuf, T. L. 2000. Optimasi Program Inseminasi Buatan pada Kerbau. *Wartazoa*. Vol. 10. No. 2 : 41 – 50.
- Toelihere, M. R. 1981. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Angkasa. Bandung.
- Watson, P. F. 1996. Cooling of Spermatozoa and Freezing Capacity. *Reprod. Dom. Anim.* 31 : 135 – 140.
- Yulnawati., Herdis., Maheswari, H., Boediono, A dan Rizal, M. 2009. Potensi Reproduksi dan Upaya Pengembangbiakan Kerbau Belang Tana Toraja. Seminar dan Lokakarya Nasional Kerbau.

