

PENGARUH KONSENTRASI GLISEROL TERHADAP KUALITAS SPERMATOZA SAPI BALI POST THAWING

Rahmatuzzahra*, Bayu Rosadi, dan Darmawan

Program Studi Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Jambi

*Korespondensi email: rahmatuzzahra08@gmail.com

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi gliserol terhadap tudung akrosom, membran plasma, dan *recovery rate*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2020 di Laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Jambi. Rancangan penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Pengaruh perlakuan diuji lanjut dengan Uji Ducan dengan 5 perlakuan dan 6 ulangan. Perlakuan ini terdiri atas P0 = 0% gliserol dalam bahan pengencer, P1 = 6% gliserol dalam bahan pengencer, P2 = 12% gliserol dalam pengencer, P3 = 18% gliserol dalam pengencer, P4 = 24% gliserol dalam pengencer trisitat kuning telur. Peubah yang diamati meliputi tudung akrosom, membran plasma, dan *recovery rate* pada spermatozoa. Data yang didapatkan dari setiap peubah di analisis dengan sidik ragam. Bila perlakuan berpengaruh nyata maka diuji lanjut menggunakan Ducan. Proses penghitungan data menggunakan program SPSS. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian gliserol berpengaruh meningkatkan dan mempertahankan kualitas tudung akrosom dan membran plasma spermatozoa sapi bali post thawing dengan konsentrasi gliserol 6% dalam pengencer tris-sitrat kuning telur melindungi spermatozoa dari berbagai cekaman selama proses kriopreservasi semen, sehingga dapat mempertahankan kualitas daya hidup tudung akrosom, membran plasma, *recovery rate* yang layak dipakai dalam program Inseminasi buatan.

Kata kunci: kualitas spermatozoa, tudung akrosom, membran plasma, *recovery rate*

Abstract. This study aims to determine the effect of glycerol concentration on the acrosome cap, plasma membrane, and recovery rate. This research was conducted in October 2020 at the Laboratory of the Faculty of Animal Husbandry, Jambi University. The design of this study used a completely randomized design (CRD). The effect of treatment was further tested with the Ducan test with 5 treatments and 6 replications. This treatment consisted of P0 = 0% glycerol in the diluent, P1 = 6% glycerol in the diluent, P2 = 12% glycerol in the diluent, P3 = 18% glycerol in the diluent, P4 = 24% glycerol in the egg yolk tricitrate diluent. The observed variables included the acrosome cap, plasma membrane, and recovery rate in spermatozoa. The data obtained from each variable were analyzed by means of a variance. If the treatment had a significant effect, it was further tested using Ducan. The process of calculating the data using the SPSS program. From the results of the study, it can be concluded that the administration of glycerol has an effect on increasing and maintaining the quality of the acrosome cap and plasma membrane of post thawing bali cattle spermatozoa with 6% glycerol concentration in egg yolk tris-citrate diluent to protect spermatozoa from various stresses during the semen cryopreservation process, so as to maintain the quality of the sperm power. live acrosomal hood, plasma membrane, recovery rate that is suitable for use in artificial insemination programs.

Keywords: spermatozoa quality, acrosome hood, plasma membrane, recovery rate

PENDAHULUAN

Sapi bali merupakan sapi yang perkembangannya tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia. Keunggulan sapi lokal yang memiliki daya adaptasi tinggi terhadap pakan yang berkualitas rendah, sistem pemeliharaan ekstensif dan memiliki daya tahan tubuh yang baik di musim tropis. Keunggulan yang dimiliki oleh sapi lokal perlu dipertahankan sebagai plasma nutfah Indonesia dan perlu dikembangkan sebagai kekayaan genetik yang dimiliki Indonesia (Johari, *et al.*, 2007). Salah satu teknologi yang telah digunakan untuk perkembangbiakan sapi adalah inseminasi buatan (IB).

Reproduksi merupakan suatu barometer untuk menilai kehidupan normal seekor ternak. Teknologi reproduksi pada ternak meliputi Inseminasi buatan, transfer embrio, fertilisasi in vitro. Salah satu reproduksi yang cocok dikembangkan di Indonesia adalah teknologi inseminasi buatan, IB merupakan cara ampuh untuk mengatasi kekurangan pejantan dan meningkatkan produktivitas ternak baik secara kualitatif dan kuantitatif. Faktor penting yang menentukan dalam keberhasilan IB adalah kualitas spermatozoa post-thawing. Sementara itu, kualitas spermatozoa post-thawing dipengaruhi beberapa faktor di antaranya adalah bahan pengencer, proses pembekuan, dan pemberian gliserol pembekuan (Toelihere, 1993).

Gliserol merupakan krioprotektan yang paling sering digunakan dalam pembekuan semen (Azizah *et al.*, 2009). Menurut Mumu (2009) gliserol dapat mencegah pengumpulan molekul-molekul air dan akan memodifikasi kristal es yang terbentuk di dalam medium sewaktu pembekuan sehingga menghambat kerusakan sel secara mekanis pada pembekuan semen sapi simental. Hal ini sesuai dengan pernyataan Evan dan Maxwell (1987) level gliserol yang umum digunakan adalah 6%-8% penggunaan kurang dari level tersebut, gliserol tidak akan memberikan efek yang berarti sedangkan jika lebih tinggi akan menimbulkan efek toksik pada spermatozoa. Oleh sebab itu, penambahan gliserol ke dalam pengencer dengan konsentrasi yang optimal adalah esensial untuk pembekuan semen agar kualitas semen seperti daya hidup dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa dapat dipertahankan. Pengencer Tris kuning telur merupakan larutan buffer yang mengandung asam sitrat yang berperan sebagai penyangga (buffer) dan fruktosa sebagai bahan energi, (Widjaya, 2011). Pengencer tris kuning telur memiliki kandungan yaitu *tris aminomethane*, asam sitrat, laktosa, raffinosa, kuning telur dan antibiotik (Mardiyah, 2001),

Tudung akrosom memiliki fungsi yang cukup penting untuk keberhasilan fertilisasi saat perkawinan. Tudung akrosom merupakan suatu selubung yang terdapat pada bagian kepala spermatozoa yang berfungsi untuk melindungi keluarnya materi genetik dan enzim enzim dari bagian kepala spermatozoa. Kerusakan tudung akrosom akan menyebabkan hilangnya kemampuan spermatozoa saat pembuahan (Arifianti, 2012). Keutuhan membran plasma sangat diperlukan oleh spermatozoa, karena kerusakan membran plasma akan berpengaruh terhadap proses metabolisme. Menurut Rizal *et al.*, (2004) apabila membran plasma sel dapat dipertahankan keutuhannya selama proses pembekuan, maka akan memberikan efek yang baik pula terhadap motilitas, daya hidup dan keutuhan tudung akrosom spermatozoa.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Jambi. Kegiatan penelitian berlangsung pada Oktober 2020. Semen yang digunakan berasal dari Sapi Bali dengan satu kali koleksi.

Rancangan percobaan pada penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dan enam ulangan, yaitu P1 (penambahan gliserol 0% dalam bahan pengencer),

P2 (penambahan gliserol 6 % dalam bahan pengencer), P3(penambahan gliserol 12% dalam bahan pengencer), P4 (penambahan gliserol 18% dalam bahan pengencer), P5 (penambahan gliserol 24% dalam bahan pengencer).

Prosedur penelitian ini dimulai Proses penampungan semen menggunakan vagina buatan yang diperoleh dari Dinas Tanaman Pangan, Holtikultura dan Peternakan Provinsi Jambi (UPT Pembibitan). Semen yang sudah di tampung secepat mungkin dibawa ke laboratorium dengan menutup tabung reaksi dengan alumunium foil supaya semen tidak terkontaminasi bakteri. Untuk penyimpanan sementara dan membawa semen dari kandang ke laboratorium menggunakan termos es yang berisi air biasa. Kemudian di proses di Laboratorium Peternakan Universitas Jambi. Semen diencerkan dengan menggunakan bahan pengencer tris sitrat kuning telur. Komposisi bahan pengencer tris sitrat kuning telur yang digunakan terdiri dari kuning telur 20 ml, asam sitrat 1,86 g, fruktosa 1,37, antibiotik (penisilin 0,1 100.000 IU/100ml dan streptomisin 0,1 g), aquabides 100 ml serta gliserol yang berbeda. Proses pembuatan bahan pengencer tris sitrat kuning telur terdiri dari dua tahap yakni pembuatan larutan *stock solution* dan pengenceran. Pembuatan larutan *stock solution* dilakukan dengan cara menambahkan tris aminomethan, citric acid, fruktosa, aquabides dengan dosis yang telah ditentukan. Proses pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan larutan $\pm 74\%$ *stock solution*, $\pm 20\%$ kuning telur, gliserol (dengan dosis yang telah ditentukan), streptomisin dan penisilin. Setelah larutan tercampur, dilakukan pengadukan dengan tujuan untuk menghomogenkan bahan pengencer (BIB Poncowati, 2012).

Setelah proses pengenceran dilakukan ekuilibrasi pada suhu 5°C. Kemudian dicampurkan dalam larutan Tris sitrat kuning telur tanpa gliserol dan disiapkan juga larutan Tris sitrat kuning telur dengan gliserol, kemudian dimasukkan kedalam lemari es dengan suhu 4-5°C selama 2 jam, setelah 2 jam larutan tersebut dicampurkan lalu dimasukan kedalam lemari es selama 2 jam. Sperma yang telah diencerkan dengan pengencer kemudian sperma dimasukan ke dalam straw 0,25 ml dengan masing-masing konsentrasi menggunakan squid. Selanjutnya menempatkan straw pada rak di dalam goblet yang berisi nitrogen cair dengan jarak 10cm dari permukaan nitrogen cair selama 5 menit, Penyimpanan pada suhu kriogenetik dalam cairan nitrogen cair dapat bertahan dalam jangka waktu yang tidak terbatas. Selanjutnya Menyiapkan penangas air dengan suhu 37°C. Mengambil straw dengan penjepit (pinset) dari kontainer dan memasukkannya kedalam penangas air selama 30 detik dan selanjutnya dibiarkan pada suhu kamar selama 5 menit kemudian di lakukan evaluasi.

Peubah Yang Diamati

Tudung akrosom diamati menggunakan metode Saacke dan White (1972). Semen sebanyak 25 μ l ditambahkan ke dalam 100 μ l larutan NaCl fisiologis yang mengandung 1% formalin. Larutan campuran dikocok perlahan sampai homogen, dibiarkan selama 5 menit. Preparat ulas tipis dari semen dibuat pada gelas objek. Pengamatan terhadap minimum 200 spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom ditandai oleh ujung kepala yang berwarna hitam tebal, sedangkan yang rusak tidak tampak tanda yang sama.

Membran plasma dievaluasi dengan metode osmotic resistance test (ORT) (Revell & Mrode 1994). Semen sebanyak 25 µl ditambahkan ke dalam 200 µl larutan hipoosmotik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Hasil inkubasi dibuat preparat ulas tipis pada gelas objek. Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x, jumlah minimum spermatozoa yang diamati adalah 200. Spermatozoa dengan membran plasma utuh dicirikan ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang rusak dicirikan ekor yang lurus.

Analisis data primer nilai *recovery rate* (RR) menggunakan rumus (Mitchell and Doak 2004) sebagai berikut

Perhitungan *recovery rate* :

$$RR = \frac{\text{motilitas spermatozoa setelah thawing}}{\text{motilitas spermatozoa segar}} \times 100\%$$

Analisis data

Data yang didapat dari setiap peubah yang diamati dengan sidik ragam. Bila perlakuan berpengaruh nyata aka dilakukan uji lanjut menggunakan uji duncan. Proses perhitungan data menggunakan program SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil rata-rata penelitian kualitas spermatozoa sapi bali post thawing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rata-rata persentase tudung akrosom, membran plasma dan *recovery rate* spermatozoa post thawing tidak berbeda nyata ($P < 0,05$). Menurut pendapat Haugana *et.al* (2007) dan Hong *et.al* (2000) penyebab utama penurunan kualitas spermatozoa seperti motilitas, viabilitas dan abnormalitas adalah adanya proses pembekuan dan thawing atau pencairan kembali setelah sperma dibekukan. Dengan adanya penambahan beberapa konsentrasi gliserol di dalam pengencer tris sitrat telur dapat meminimalisir kematian spermatozoa. Pengaruh konsentrasi gliserol terhadap persentase daya tahan hidup spermatozoa sapi post thawing dapat dilihat pada tabel 1:

Tabel 1. Rataan Tudung Akrosom, Membran Plasma, dan *recovery rate* Spermatozoa Sapi Bali Post Thawing

| Perlakuan | Tudung Akrosom | Membran Plasma | <i>recovery rate</i> |
|-----------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| P0 | 20,00 ± 0 ^a | 41,50, ± 1,26 ^a | 5,00 ± 0,00 ^a |
| P1 | 45,49 ± 0,89 ^d | 55,55 ± 1,32 ^c | 58,00 ± 0,89 ^d |
| P2 | 38,67 ± 2,07 ^c | 53,50 ± 2,42 ^{bc} | 51,67 ± 2,07 ^c |
| P3 | 32,47 ± 9,17 ^{bc} | 46,67 ± 1,63 ^{ab} | 40,83 ± 9,17 ^c |
| P4 | 21,87 ± 5,84 ^{ab} | 44,50 ± 2,42 ^a | 19,17 ± 5,84 ^b |

Keterangan: superskrip yang berbeda pada kolom yang sama dinyatakan tidak berbeda nyata ($P < 0,05$)

Tudung Akrosom

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berbagai level gliserol di dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur memberikan pengaruh terhadap tudung akrosom . Konsentrasi gliserol P1 nyata lebih tinggi yaitu 45,49% diikuti dengan P2 (38,67%), P3 (32,47%), dan P4 (21,87%). Pemberian gliserol 6% memberikan hasil yang paling optimal terhadap keutuhan tudung akrosom setelah thawing. Hal ini sesuai dengan pendapat Tabing *et.,all* (2000) dimana penambahan gliserol 6% memberikan presentase

TAU sebesar 47,58%. Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa level gliserol dalam pengencer tris sitrat kuning telur berpengaruh nyata terhadap keutuhan tudung akrosom.

Penambahan dosis gliserol 6% pada bahan pengencer tris sitrat kuning telur mampu memberikan perlindungan sehingga pengaruh kerusakan sel akibat cekaman dingin (*cold shock*) dapat dicegah. Kerusakan tudung akrosom di sebabkan oleh kristal-kristal es akibat dehidrasi sel yang berlebihan dalam proses pembekuan semen yang menyebabkan enzim-enzim pelebur dinding ovum pada tudung akrosom akan turut pula rusak. Menurut Siswanto (2006) Penambahan gliserol yang tepat memberikan perlindungan berupa memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk selama proses pembekuan, sehingga kerusakan organel-organel sel spermatozoa dapat dihindarkan.

Pemberian gliserol pada konsentrasi 0%, 12%, 18%, dan 24%. Menghasilkan tudung akrosom yang rendah di bandingkan dengan konsentrasi 6%, hal itu dapat disebabkan karena konsentrasi yang terlalu tinggi akan mengakibatkan efek toksik bagi spermatozoa.

Membran Plasma

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan berbagai level gliserol di dalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur memberikan pengaruh terhadap tudung akrosom . Konsentrasi gliserol P1 nyata lebih tinggi yaitu (55,55%) diikuti dengan P2 (53,50%), P3 (46,67%), dan P4 (44,50%). Pemberian gliserol 6% memberikan hasil yang paling optimal terhadap keutuhan tudung akrosom setelah thawing. Pada perlakuan P1 memberikan rata-rata tertinggi atau terbaik setelah thawing, kualitas pengenceran spermatozoa sapi bali post thawing dalam pengencer tris sitrat kuning telur dengan konsentrasi gliserol yang berbeda yaitu dengan rata-rata (55,55%).

Dengan demikian dosis gliserol sebesar 6% dalam pengencer Tris telah mampu berinteraksi dengan membran plasma, yaitu dengan jalan melenturkan membran dan tidak mudah rapuh sehingga kerusakan karena retak yang tidak dapat dipulihkan kembali dapat diatasi. Hal ini didukung lagi bila dilihat dari tingkat penurunan persentase MPU spermatozoa dari pengenceran sampai thawing dimana tingkat penurunan persentase MPU spermatozoa pada penambahan gliserol 6% nyata lebih rendah dibandingkan pada penambahan gliserol 12%, 18% dan 24%. penambahan gliserol 6% dapat memberikan perlindungan terhadap keutuhan akrosom. Dengan terpeliharanya tudung akrosom selama proses pembekuan maka diharapkan enzim-enzim tetap ada, sehingga daya fertilitas tinggi. Protein berupa enzim-enzim pada tudung akrosom memegang peranan penting dalam menginduksi reaksi akrosom dan interaksi dengan zona pelusida (Sanchez et al., 1995).

Recovery Rate

Recovery rate adalah kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan cara membandingkan motilitas spermatozoa setelah thawing dengan motilitas spermatozoa segar (Hafez, 2000). Berdasarkan hasil perhitungan di peroleh rata-rata yang tertera pada Tabel 1 yaitu sebesar P1 (58,00%), P2 (51,67%), P3 (40,83%), P4 (19,17%) yang menunjukkan bahwa lama penyimpanan dapat menurunkan persentase dari *recovery rate* ($P < 0,05$).

Nilai RR paling tinggi yang di dapat yaitu sebesar 58,00% dan nilai RR terendah yang di dapat yaitu 19,17%. Semakin tinggi nilai *recovery rate* menandakan semakin tinggi pula ketahanan sperma dan sebaliknya semakin rendah nilainya maka menandakan semakin rendah kemampuan spermatozoa bertahan. Oleh karena itu, nilai *recovery rate* yang semakin tinggi akan menunjukkan kualitas spermatozoa yang semakin baik (Garner and Hafez, 2000). Kerusakan sel akibat pembekuan dapat terjadi karena dehidrasi, peningkatan konsentrasi elektrolit, serta terbentuknya kristal es intraseluler yang dapat mempengaruhi permeabilitas dinding sel (Kwon *et al.*, 2002), dan pada akhirnya spermatozoa kehilangan daya motilitasnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan gliserol 6% didalam bahan pengencer tris sitrat kuning telur adalah dapat melindungi spermatozoa dari berbagai cekaman selama proses kriopreservasi semen, sehingga dapat mempertahankan kualitas daya hidup tudung akrosom, membran plasma, *Recovery rate* yang layak dipakai dalam program Inseminasi buatan.

DAFTAR PUSTAKA

- Azizah, Arifiantini RI. 2009. Kualitas Semen Beku Kuda Pada Pengencer Pusu Skim Dengan Konsentrasi Gliserol Yang Berbeda. *Jurnal Veteriner*. 10(2):63-70
- Awda, Basim J, Mackenzie-Bel MI, Marry M, Buhr. 2009. Reactive Oxygen Species and Boar Sperm Function. *Biol reprod*. 8: 553-561.
- Arifiantini RI. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan, 18 IPB Press. Bogor
- Evans, G. dan W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Sydney: Butterworths.
- Feradis. 1999. Penggunaan Antioksidan Dalam Pengencer Semen Beku dan Metode Sinkronisasi Estrus Pada Program Inseminasi Buatan Domba St.Croix. Disertasi. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Garner, D. L. and E. S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction In Farm Animals*. Edited by E. S. E. Hafez. 7th Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Maryland. USA.
- Hafez, E.S.E., and B. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hugana T, Grohn YT, Kommisrud E, E, Rosptad, O Raksen .2007. Effects of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow coception. *Animal Reproduction Science* 97:1-11.
- Hong JHU, QLI, Wang YL Chen, JlangZL, YH, LQW Ou BB Jia,. 2000. Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *Turkic Journal Veterinary and Animal Science* 35:379-384.
- Ichwandi. I. 2004. Performans Motilitas, Tudung Akrosom Utuh dan Velositas Spermatozoa Tanpa dan dengan Metode 'Swim Up' Pasca Thawing pada Semen Beku Sapi Potong. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Diponegoro. Semarang.
- Miranda PV, Allaire A, Sosnik J, Visconti PE. 2009. Localization of Low Density Detergent Resistant Membrane Proteins In Intact and Acrosome Reacted Mousesprema. *Biology Reproduction* 80:897-904.
- Mumu, M.I., 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental Yng Di Bekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Jurnal Agroland*. 16(2): 172-179.

- Rizal, M. 2004. Penyimpanan Epididimis Pada Suhu 5°C Selama Tiga Hari: Pengaruhnya Terhadap Kualitas Spermatozoa Yang Telah Dibekukan. *Media Kedokteran Hewan* 20:5-62.
- Samsudewa, D., M.I.S. Wuwuh, dan Y.S. Ondho. 2007. Pengaruh jumlah spermatozoa per inseminasi terhadap kualitas semen beku kambing peranakan Etawa. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. 462-468.
- Sanchez, R., J. Risopatron, G. Sepulveda, P. Pena And W. Miska. 1995. Evaluation of the acrosomal membrane in bovine spermatozoa : effect of proteinase inhibitors. *Theriogenology*, 43 : 761-768.
- Siswanto, 2006. Kualitas Semen di dalam Pengencer Tris dan Natrium Sitrat dengan Berbagai Sumber Karbohidrat dan Level Gliserol Pada Proses Kriopreservasi Semen Rusa Timor (*Cervus timorensis*). Tesis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. SNI 4896.1. 2008. Semen Beku Sapi. Badan Standarisasi Nasional (BSN) : Jakarta. sisni.bsn.go.id/index.php?/sni_main/sni/detail_sni/7026. Diakses pada 5 Maret 2014..
- Surachman, .M., Herdisa., Yulnawati., Rizal, M., Maheshwari, H., 2009. Kualitas Semen Cair Asal Epididimis Kerbau Belang Dalam Bahan Pengencer Andromend Yang Mendapat Penambahan Sukrosa. *Media Peternakan*. 32(2) : 88-94.
- Tambing, S. N., M. R Toelihere., T. L. Yusuf, dan I. K. Utama. 2000. Pengaruh Gliserol Dalam Pengencer Tris Terhadap Kualitas JITV. 5(2): 3-7.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa, cetakan ke 3, Bandung.
- Vassilev N, Yotov S, Dimitrov F. 2005. Incidence of early embryonic death in dairy cows. *Trakia J of Scie* 3(5): 62-64.
- Zelpina, E., B. Rosadi, dan T. Sumarsono. 2012. Kualitas Spermatozoa Pops Thawing dari Semen Beku Sapi Perah. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. 15(2) : 94-102.