

PENGARUH LAMA WAKTU *THAWING* TERHADAP KUALITAS SEMEN KERBAU LUMPUR (*BUBALUS BUBALIS*)

THE EFFECT OF THAWING TIME ON THE QUALITY OF MUD BUFFALO SEMEN (BUBALUS BUBALIS)

Windi Yolanda, Rini Elisia*, Maiyontoni, Refika Komala

Program Studi Peternakan, Departemen Agroindustri, FMIPA, Universitas Negeri Padang, Indonesia

*E-mail korespondensi: rinielisia@fmipa.unp.ac.id

ABSTRAK

Inseminasi Buatan (IB) pada kerbau di Indonesia masih menghadapi tantangan, salah satunya adalah rendahnya kualitas semen beku akibat proses *thawing* yang kurang tepat. Semen kerbau memiliki keunggulan fisiologis, namun juga lebih rentan terhadap kerusakan saat proses *thawing* dan kriopreservasi. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa lama waktu *thawing* berpengaruh terhadap motilitas sperma. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen kerbau guna meningkatkan keberhasilan IB. Penelitian ini menggunakan 20 *straw* semen beku kerbau dengan metode penelitian eksperimen dan analisis data menggunakan RAK yang terdiri dari 4 perlakuan (P1: 30 detik, P2: 60 detik, P3: 90 detik, P4: 120 detik) dan 5 ulangan. Parameter pengamatannya adalah PTM (*Post Thawing Motility*), viabilitas, abnormalitas, MPU (Membran Plasma Utuh) dan TAU (Tudung Akrosom Utuh). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai rata-rata PTM, viabilitas, abnormalitas, MPU, dan TAU dari keempat perlakuan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa *thawing* semen beku kerbau sampai 120 detik (2 menit) pada suhu 37°C, masih dapat mempertahankan viabilitas, abnormalitas, angka MPU dan angka TAU sperma kerbau sebelum di inseminasikan, ada kecenderungan angka PTM dan MPU pada *thawing* 120 detik lebih tinggi dibanding perlakuan lainnya. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan *thawing* selama 30 detik, 60 detik, 90 detik dan 120 detik tidak memberikan perbedaan nyata terhadap PTM, viabilitas, abnormalitas, MPU dan TAU semen beku kerbau sehingga *thawing* sampai 120 detik masih dapat dilakukan.

Kata Kunci: Kerbau, Semen Beku, Waktu *Thawing*

ABSTRACT

Artificial insemination (AI) in buffaloes in Indonesia still faces challenges, one of which is the low quality of frozen semen due to improper thawing processes. Buffalo semen has physiological advantages, but it is also more susceptible to damage during thawing and cryopreservation processes. Previous studies have shown that thawing time affects sperm motility. This study aims to determine the effect of thawing time on buffalo semen quality in order to improve AI success rates. This study used 20 straws of frozen buffalo semen with an experimental research method and data analysis using RAK, consisting of 4 treatments (P1: 30

seconds, P2: 60 seconds, P3: 90 seconds, P4: 120 seconds) and 5 replicates. The observation parameters were PTM (Post Thawing Motility), viability, abnormality, MPU (Membrane Plasma Integrity), and TAU (Acrosome Cap Integrity). The results showed that the mean values of PTM, viability, abnormality, MPU, and TAU of the four treatments were not significantly different ($P > 0.05$). These results indicate that thawing frozen buffalo semen for up to 120 seconds (2 minutes) at a temperature of 37 °C can still maintain the viability, abnormalities, MPU count, and TAU count of buffalo sperm before insemination. There is a tendency for the PTM and MPU counts in the 120-second thawing treatment to be higher than in the other treatments. Based on the research results, it can be concluded that thawing for 30 seconds, 60 seconds, 90 seconds, and 120 seconds did not produce significant differences in PTM, viability, abnormalities, MPU, and TAU of frozen buffalo semen, so thawing up to 120 seconds can still be done.

Keywords: Buffalo, Frozen Semen, Thawing Time

PENDAHULUAN

Kerbau di Indonesia umumnya masih hidup dalam kondisi setengah liar atau bahkan liar terutama yang dipelihara oleh peternak di daerah pedesaan dan daerah tropis, sehingga kerbau cenderung memiliki perilaku yang lebih agresif dan sulit dijinakkan sehingga proses inseminasi memerlukan keterampilan dan kesabaran lebih.

Tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada kerbau di Indonesia masih tergolong rendah dibandingkan dengan sapi. Menurut data dari Badan Litbang Pertanian (2020), tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada kerbau hanya mencapai sekitar 30-40%, sementara pada sapi dapat mencapai 60-70%. Beberapa faktor yang mempengaruhi rendahnya tingkat keberhasilan ini adalah kualitas semen beku yang digunakan, waktu *thawing* yang tidak tepat, kualitas kontrol semen beku yang kurang optimal, serta perilaku alami kerbau yang lebih sulit ditangani dibandingkan sapi.

Proses *thawing* yang tidak tepat, baik dari segi waktu maupun suhu, dapat merusak kualitas semen dan menurunkan tingkat keberhasilan inseminasi. Penelitian Solis *et al.* (2024) menyatakan bahwa pencairan semen dengan waktu *thawing* yang berbeda (30

sampai 45 detik) dapat memengaruhi motilitas spermatozoa pada sapi perah. Penelitian lain oleh Febriansyah *et al.*, (2024), penggunaan waktu *thawing* semen beku sapi untuk melihat dampaknya terhadap kualitas semen dengan perlakuan yang serupa yaitu menggunakan perlakuan *thawing* dengan rentang waktu antara 15 sampai 30 detik yang menunjukkan adanya perbedaan tidak signifikan terhadap motilitas sperma antar perlakuan *thawing*.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *thawing* yang terlalu cepat atau terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan pada membran sperma yang berakibat pada penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa (Sansone *et al.*, 2000). Ketiga penelitian ini memberikan gambaran mengenai pengaruh lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen baik pada sapi maupun kerbau, namun penelitian terdahulu lebih banyak dilakukan pada sapi, sehingga masih terbatas data empiris pada semen kerbau lumpur. Untuk dapat mengetahui seberapa besar waktu *thawing* mempengaruhi kualitas sperma kerbau setelah *thawing*, maka penulis tertarik melakukan penelitian yang berjudul Pengaruh Lama Waktu *Thawing* Terhadap Kualitas Semen Kerbau Lumpur (*Bubalus Bubalis*). Tujuan penelitian ini adalah

untuk mengetahui pengaruh lama waktu *thawing* terhadap kualitas semen kerbau.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Produksi Balai Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato, Ibh, Payakumbuh, Sumatera Barat pada bulan Februari hingga April 2025. Alat yang digunakan pada saat penelitian adalah kontainer semen beku, *water bath*, *stop watch*, mikroskop, CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*), *object glass*, *cover glass*, *microtube*, *micropipette*, pinset, gunting, tisu serta alat-alat yang digunakan dalam proses *thawing* semen. Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 *straw* semen beku kerbau lumpur, alkohol, pewarna *eosin-nigrosin*, larutan HOST (*Hypo-osmotic Swelling Test*), larutan TAU dan nitrogen cair.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental. Analisa data menggunakan metode statistik Rancangan Acak Kelompok dengan 4 perlakuan waktu *thawing* sebagai kelompok dimana setiap kelompok 5 kali ulangan. Faktor pengelompokan berdasarkan waktu dengan perlakuan variasi waktu *thawing* yaitu, P1 (*Thawing* semen selama 30 detik), P2 (*Thawing* semen selama 60 detik), P3 (*Thawing* semen selama 90 detik), P4 (*Thawing* semen selama 120 detik).

Parameter pengamatan adalah PTM (*Post Thawing Motility*) di analisis menggunakan komputer CASA (*Computer Assisted Semen Analysis*) untuk mengamati pergerakan sperma. Ajeet Kumar *et al.*, (2016), menemukan bahwa parameter motilitas progresif dan kecepatan gerak spermatozoa yang diukur dengan CASA memiliki korelasi positif yang signifikan dengan tingkat keberhasilan inseminasi buatan pada kerbau.

Viabilitas Sperma dievaluasi menggunakan pewarnaan *eosin-nigrosin* dengan perbandingan 1:1 di atas *object glass* dan diulas dengan menggunakan *object glass*

lain. Spermatozoa hidup tidak menyerap pewarna dan tampak transparan sedangkan spermatozoa mati menyerap pewarna dan tampak berwarna (Putra *et al.*, 2022).

Abnormalitas Sperma, cara perhitungan dan pembuatan ulasan sama dengan cara menghitung viabilitas, hanya saja dibandingkan antara spermatozoa yang normal dan abnormal. Spermatozoa abnormal bisa dilihat dan bentuk morfologi spermatozoa itu sendiri, bentuk-bentuk spermatozoa abnormal diantaranya adalah kepala yang terlalu besar, ekornya putus, ekor bercabang, ekornya melingkar dan sebagainya (Fafandri *et al.*, 2023).

Membran Plasma Utuh (MPU) merujuk pada kondisi dimana membran plasma sperma utuh atau tidak rusak. Pengukuran Membran Plasma Utuh (MPU) dapat dilakukan dengan mencampurkan semen beku dengan larutan *Hypo-osmotic Swelling Test* (HOST) yang kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Selanjutnya diamati menggunakan mikroskop (Purwanta *et al.*, 2024).

Tudung Akrosom Utuh adalah organel pada kepala sperma yang mengandung enzim penting untuk penetrasi zona pelusida oosit. Keutuhan akrosom esensial untuk keberhasilan fertilisasi. Untuk mengukur TAU dilakukan dengan mencampurkan semen beku dengan larutan TAU. Sperma dengan akrosom utuh menunjukkan ujung kepala yang berwarna hitam tebal setelah pewarnaan Furi *et al.*, 2013. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *Analysis Of Variance* (ANOVA), menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Jika terdapat pengaruh antar kelompok dilakukan uji lanjut menggunakan Uji DMRT (*Duncant Multiple Range Test*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil rata-rata pemeriksaan kualitas semen segar kerbau lumpur secara makroskopis dan mikroskopis dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada tabel 1, terlihat bahwa rata-rata hasil pemeriksaan semen segar dengan 5 kali ulangan penampungan, secara makroskopis menunjukkan volume semen yang dikoleksi 2,96 ml, memiliki warna krem, konsistensi encer, pH 6,52 dan bau yang khas semen kerbau.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Kualitas Semen Segar Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*)

Parameter	Rata-rata±SD
Volume (ml)	2,96±0,83
Warna	Krem
Konsistensi	Encer
Derajat Keasaman (pH)	6,52±0,10
Bau	Khas
Konsentrasi (106/ml)	1411±503,09
Gerakan Massa	++
Motilitas (%)	84±0,02

Sumber : Data Penelitian 2025.

Hasil pemeriksaan ini menunjukkan bahwa semen yang dikoleksi memenuhi syarat untuk dilakukannya proses pengenceran. SNI 2024 Semen beku berasal dari semen segar dengan motilitas progresif spermatozoa progresif minimum 70%. Hasil penelitian ini lebih tinggi dari Yani *et al.*, (2025), dengan hasil volume semen kerbau lumpur yang dikoleksi rata-rata 2,26 ml dengan konsentrasi 1182 dan motilitas 71%.

Perbedaan ini bisa saja dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti nutrisi, pakan dan faktor iklim. Sementara menurut Vale *et al.*, (2014), semen segar kerbau umumnya berwarna putih krem atau kekuningan, dengan pH berkisar antara 6,2 hingga 7,0. Nilai-nilai ini menunjukkan bahwa semen segar pada penelitian ini memiliki kualitas fisik yang sesuai standar dan layak untuk dilakukan proses pengenceran.

Konsentrasi spermatozoa mencapai 1411 ± 503 juta/ml, yang merupakan angka cukup tinggi dan menandakan jumlah sperma dalam ejakulat sangat mencukupi untuk proses inseminasi buatan. Gerakan

massa yang diamati, yaitu (++) menunjukkan aktivitas gerakan spermatozoa yang cukup baik. Tingginya nilai gerakan massa menunjukkan bahwa sebagian besar sperma dalam sampel memiliki aktivitas motilitas yang baik dan bergerak aktif yang berhubungan dengan keberhasilan fertilisasi (Manehat *et al.*, 2021). Sementara itu, hasil rata-rata motilitas mencapai 84 ± 0,02, yang menunjukkan kemampuan sperma untuk bergerak aktif dan berpeluang besar untuk membuahi sel telur. Motilitas spermatozoa yang baik pada kerbau berada di atas 70%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa berada pada tingkat yang ideal yang sangat memengaruhi keberhasilan fertilisasi. Sebagian besar indikator kualitas semen segar kerbau berada dalam batas normal yang telah dilaporkan dalam berbagai penelitian sebelumnya.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa semen kerbau memiliki potensi fertilisasi yang baik. Hal ini sejalan dengan Vale *et al.*, (2014), yang menjelaskan bahwa karakteristik semen seperti volume, pH, kekentalan, dan motilitas yang optimal dapat meningkatkan peluang keberhasilan dalam program inseminasi buatan pada kerbau. Dengan demikian, semen segar yang digunakan dalam penelitian ini dapat dikategorikan memiliki kualitas yang layak dan sesuai dengan standar yang dibutuhkan untuk pelaksanaan program inseminasi buatan (IB).

Post thawing motility merupakan parameter paling dasar namun sangat penting dalam evaluasi kualitas semen beku. PTM menunjukkan persentase spermatozoa yang mampu bergerak, baik secara progresif maupun non-progresif dan menjadi indikator utama untuk menilai apakah sperma cukup aktif untuk mencapai sel telur. Pemeriksaan motilitas dilakukan dengan menggunakan *Computer-Assisted Semen Analysis (CASA)*. Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Rataan PTM Semen Beku Kerbau Lumpur (*Bubalus bubalis*) setelah *Thawing*.

Perlakuan	Rata-rata
P1	64,44 ± 11,69 ^{NS}
P2	61,73 ± 9,97 ^{NS}
P3	66,60 ± 16,28 ^{NS}
P4	69,08 ± 14,12 ^{NS}

Sumber : Data Penelitian 2025.

Berdasarkan Tabel 2, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap motilitas semen beku kerbau setelah *thawing*.

Perbandingan antara perlakuan menghasilkan rata-rata motilitas sperma yang bervariasi dengan perlakuan P4 memiliki rata-rata tertinggi yaitu ($69,08 \pm 14,12$), diikuti oleh P3 ($66,60 \pm 16,28$), P1 ($64,44 \pm 11,69$), dan P2 ($61,73 \pm 9,97$). Hal ini diduga *thawing* 30 detik sampai *thawing* 120 detik tidak menyebabkan penurunan terhadap angka motilitas spermatozoa selama masih berada pada rentang suhu *thawing* yang ideal (37°C) sehingga kerusakan membran sel dan struktur intraseluler dapat diminimalkan. Hal ini sejalan dengan pendapat Shah *et al.*, (2016) yaitu selama protokol *thawing* tetap berada dalam rentang suhu aman yang umum digunakan variasi durasi singkat tidak selalu mengubah integritas membran atau fungsi mitokondria yang menentukan motilitas.

Penelitian ini sejalan dengan Mustofa *et al.*, (2022), yang menunjukkan bahwa waktu *thawing* hingga 120 detik masih menghasilkan motilitas *post-thaw* yang baik karena perlindungan lipid kuning telur yang tinggi. Kemampuan spermatozoa mempertahankan angka motilitas pasca *thawing* tidak terlepas dari bahan pengencer (*extender*) yang digunakan yaitu tris kuning telur yang digunakan dan metode kriopreservasi yang digunakan. Tris kuning telur merupakan bahan pengencer yang umum digunakan dalam kriopreservasi semen kerbau karena memiliki kandungan yang sangat mendukung kelangsungan hidup

spermatozoa. Dalam kuning telur terdapat senyawa lipoprotein densitas rendah LDL (*Low-Density Lipoproteins*) yang berperan penting dalam melindungi membran sel spermatozoa dari kerusakan selama proses *thawing* dan kriopreservasi. Rusco *et al.*, (2019), menyebutkan bahwa LDL dari kuning telur membentuk lapisan pelindung di sekitar membran spermatozoa sehingga mampu mengurangi kerusakan akibat perubahan suhu ekstrim selama kriopreservasi. Selain itu, fosfolipid dan fraksi LDL yang mengandung kolesterol yang juga terkandung dalam kuning telur berperan melindungi membran plasma spermatozoa selama proses pembekuan dengan mengurangi efusi kolesterol dan mempertahankan keseimbangan kolesterol-fosfolipid sehingga membantu mempertahankan motilitas dan integritas membran pasca *thawing* (Simonik *et al.*, 2019).

Tris sendiri, sebagai buffer, berfungsi untuk menjaga pH larutan tetap stabil, sedangkan gliserol yang ditambahkan berperan sebagai cryoprotectant untuk mencegah terbentuknya kristal es yang merusak struktur sel sperma (Mehmood *et al.*, 2017). Kuning telur juga mengandung antioksidan seperti *cysteine* atau *ascorbic acid* yang membantu mengurangi stres oksidatif selama proses pembekuan (Patel *et al.*, 2016). Oleh karena itu, penggunaan Tris kuning telur sebagai bahan pengencer, krioprotektan dan antioksidan yang tepat terbukti efektif dalam menjaga kualitas spermatozoa selama proses kriopreservasi. Penelitian oleh Ozimic *et al.*, (2023), sebagian besar kerusakan semen beku terjadi selama proses freezing dan bahwa pengaruh *thawing* bergantung pada seberapa baik kerusakan awal dikontrol.

Proses *thawing* semen beku kerbau umumnya dilakukan pada suhu 37°C selama 30–60 detik (SNI 2024). Hasil menunjukkan durasi *thawing* yang diperpanjang hingga 120 detik diduga tidak menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa selama suhu tetap stabil dan pengencer yang digunakan

mengandung komponen pelindung seperti Tris dan kuning telur. Hal ini menunjukkan bahwa Tris kuning telur memiliki kapasitas protektif yang kuat terhadap spermatozoa bahkan pada durasi *thawing* yang lebih lama. Perlindungan ini sangat penting dalam mempertahankan motilitas spermatozoa pasca-*thawing*. Motilitas spermatozoa yang tinggi pasca-*thawing* mencerminkan kondisi fisiologis yang baik, terutama integritas membran plasma dan aktivitas mitokondria yang mendukung gerakan.

Penelitian oleh Shah *et al.*, (2017), yang menunjukkan bahwa penggunaan plasma kuning telur ayam 20% dalam pengencer Tris-citric mampu meningkatkan motilitas progresif dan tingkat fertilitas *in vivo* dibandingkan penggunaan kuning telur utuh. Selain itu, penelitian oleh Shahverdi *et al.*, (2014), juga menunjukkan bahwa pengencer Tris-citric dengan kuning telur 20% dan gliserol 7% yang digunakan dalam prosedur *thawing* 30 detik pada suhu 37°C mampu menjaga kualitas spermatozoa secara optimal. Meskipun penelitian oleh Naz *et al.*, (2019), menggunakan kuning telur burung unta, kandungan fosfolipid dan kolesterol yang serupa juga memberikan perlindungan yang setara, yang semakin menguatkan bukti bahwa kuning telur ayam memiliki manfaat serupa.

Thawing pada waktu yang cukup lama, seperti 90–120 detik diduga dapat memberi waktu bagi semen untuk mencair berjalan lebih baik (stabil). Penelitian oleh Ansari *et al.*, (2011), menyatakan bahwa *thawing straw* 0,25 mL pada suhu 37°C selama 30–60 detik menghasilkan motilitas spermatozoa lebih tinggi dibandingkan *thawing* singkat karena distribusi panas yang lebih merata dan perlindungan yang lebih baik terhadap membran sel. Menurut Khalil *et al.*, (2025), penggunaan durasi *thawing* yang cukup memungkinkan proses pencairan es mikro berjalan sempurna sehingga mengurangi kerusakan mekanik pada membran sel dan mempertahankan aktivitas spermatozoa.

Walaupun perbedaan antar perlakuan tidak terlalu besar, peningkatan motilitas yang konsisten dari 60 detik ke 120 detik menunjukkan bahwa durasi *thawing* merupakan faktor penting yang mempengaruhi hasil fertilitas semen beku kerbau.

Penilaian viabilitas dilakukan melalui pewarnaan diferensial seperti *eosin-nigrosin* untuk membedakan antara spermatozoa hidup dan mati. Spermatozoa hidup memiliki membran plasma utuh sehingga tidak menyerap pewarna, sedangkan spermatozoa mati menyerap pewarna karena kerusakan membrannya (Saini *et al.*, 2020). Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan telah diolah dan disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Rataan Viabilitas Semen Beku Kerbau setelah *Thawing*.

Perlakuan	Rata-rata
P1	82,19 ± 8,10 ^{NS}
P2	87,22 ± 4,40 ^{NS}
P3	85,02 ± 7,13 ^{NS}
P4	86,68 ± 5,22 ^{NS}

Sumber : Data Penelitian 2025.

Tabel 3 menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap viabilitas semen beku kerbau lumpur setelah *thawing*. Nilai viabilitas semen kerbau lumpur berkisar antara 82–86%, lebih tinggi dari penelitian Akhter *et al.*, (2010), *thawing* semen beku kerbau memberikan viabilitas spermatozoa rata-rata sekitar 78–80% dengan tingkat kerusakan akrosom berkisar antara 15–18% yang menunjukkan kualitas pasca *thawing* yang optimal.

Thawing pada suhu 37°C selama 30 hingga 60 detik memang merupakan standar umum, namun dalam kasus tertentu, spermatozoa dapat bertahan lebih lama ketika protokol pembekuan dan bahan pengencernya mendukung stabilitas sel. Penelitian Nicolae *et al.*, (2014), pada semen beku domba, tidak ditemukan perbedaan signifikan dalam viabilitas antara *thawing*

pada suhu 50°C selama 30 detik dan suhu 39°C selama 120 detik. Ini membuktikan bahwa ketahanan spermatozoa terhadap variasi waktu *thawing* cukup tinggi selama protokol pembekuan dilakukan dengan baik. Berdasarkan temuan ini, *thawing* selama 120 detik pada suhu yang tepat dapat dianggap aman dan tetap mempertahankan viabilitas spermatozoa dalam batas yang layak untuk inseminasi buatan. Walaupun perlakuannya lebih lama dari SNI 2024 yaitu 30–60 detik, ternyata di waktu 120 detik daya hidup spermatozoa masih bagus jika suhu dikontrol dengan baik dan pengencer yang digunakan mampu mendukung kehidupan sperma.

Penelitian ini sejalan dengan Dobrin *et al.*, (2014), yang menunjukkan bahwa waktu *thawing* hingga 120 detik masih menghasilkan viabilitas yang baik.

Namun hal ini kurang sesuai dengan pendapat Sansone *et al.*, (2000), yang menyatakan bahwa *thawing* yang terlalu cepat atau terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan pada membran sperma yang berakibat pada penurunan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Hasil ini menunjukkan bahwa *thawing* yang lebih lama dari standar SNI tetap dapat diaplikasikan dengan aman selama suhu terkontrol dan pengencer mampu menjaga stabilitas membran spermatozoa.

Abnormalitas spermatozoa merujuk pada gangguan bentuk dan struktur sperma setelah proses *thawing*, seperti cacat pada kepala, leher, atau ekor. Semakin tinggi persentase sel sperma abnormal maka semakin rendah peluang fertilisasi, baik secara alami maupun melalui inseminasi buatan (Ghirardosi *et al.*, 2018). Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan telah diolah dan disajikan dalam Tabel 4.

Berdasarkan tabel 4, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P > 0,05$) terhadap abnormalitas semen beku kerbau setelah *thawing*. Tabel 4 juga menunjukkan bahwa meskipun antar perlakuan tidak

terdapat perbedaan yang nyata, namun ada kecenderungan, semakin lama waktu *thawing* angka abnormalitas spermatozoa semakin meningkat. Hal ini memberikan gambaran dengan meningkatnya waktu *thawing*, nilai abnormalitas spermatozoa semakin meningkat. Peningkatan abnormalitas ini diduga disebabkan oleh lamanya paparan suhu hangat selama *thawing* yang dapat merusak bagian luar sel sperma (membran) dan bagian seperti kepala atau ekor sperma. Kerusakan ini menyebabkan bentuk sperma menjadi tidak normal. Menurut Zhang *et al.*, (2021), *thawing* pada suhu hangat dalam waktu yang terlalu lama dapat mengganggu integritas membran plasma dan kerusakan struktural sperma sehingga meningkatkan jumlah sperma abnormal. Selain itu, proses *thawing* yang terlalu lama juga bisa menimbulkan stres oksidatif yaitu kondisi di mana sel sperma terkena radikal bebas yang merusak struktur dalam sel dan menyebabkan jumlah sperma abnormal bertambah. Hal ini diperkuat oleh temuan Gurler *et al.*, (2016), yang menyebutkan bahwa *thawing* semen beku dapat meningkatkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang pada akhirnya menyebabkan peroksidasi lipid, kerusakan DNA dan kerusakan akrosom. Kondisi ini sangat mempengaruhi kualitas spermatozoa, termasuk peningkatan morfologi abnormal sperma.

Tabel 4. Rataan Abnormalitas Semen Beku Kerbau setelah *Thawing*.

Perlakuan	Rata-rata
P1	11,72 ± 5,08 ^{NS}
P2	13,50 ± 6,21 ^{NS}
P3	17,87 ± 11,31 ^{NS}
P4	18,83 ± 9,89 ^{NS}

Sumber: Data Penelitian 2025.

Secara biologis, nilai abnormalitas di bawah 15% seperti yang dicapai pada P1 dan P2 dianggap baik dan tidak signifikan menurunkan keberhasilan fertilisasi *in vivo*,

sebagaimana dijelaskan oleh Sharafi *et al.*, (2022), bahwa abnormalitas <15% secara umum tidak mempengaruhi tingkat kebuntingan. Sementara nilai P3 dan P4 yang menyentuh hingga 18–19% masih dapat diterima, namun mengindikasikan terjadi peningkatan yang harus diperhatikan.

Membran plasma utuh spermatozoa kerbau setelah proses *thawing* mencerminkan sejauh mana sel sperma mampu mempertahankan integritas membran luarnya yang penting untuk mencegah kebocoran enzim, menjaga kemampuan bergerak, dan melindungi materi genetik. Semakin tinggi persentase MPU, semakin besar peluang keberhasilan fertilisasi baik secara alami maupun buatan karena membran yang utuh mendukung stabilitas osmotik dan fungsi biologis sel (Arvioges *et al.*, 2021). Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan telah diolah dan disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Rataan MPU Semen Beku Kerbau setelah *Thawing*.

Perlakuan	Rata-rata
P1	83,92 ± 15,60 ^{NS}
P2	90,94 ± 6,99 ^{NS}
P3	88,01 ± 10,25 ^{NS}
P4	93,65 ± 1,58 ^{NS}

Sumber: Data Penelitian 2025.

Berdasarkan tabel 5, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap MPU semen beku kerbau setelah *thawing*. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan secara statistik antar perlakuan yang menunjukkan bahwa semua durasi *thawing* mempertahankan MPU secara efektif. Temuan ini sejalan dengan penelitian oleh Miraz *et al.*, (2022), yang mencatat penurunan sekitar 20–27% pada integritas membran *pasca-thaw* semen beku Murrah buffalo ketika menggunakan protokol *cryopreservation* standar, namun tetap menunjukkan MPU di atas 60%. Ini

mengindikasikan bahwa rentang 84–94% yang dicapai dalam penelitian ini menggambarkan kualitas yang sangat baik.

Penelitian oleh Ansari *et al.*, (2011), juga mendukung hasil ini dengan menemukan bahwa modem lembu mikro *straw* 0,25 mL dan waktu *thawing* 30–60 detik memberi perlindungan optimal pada membran plasma dan memperbaiki MPU setelah *thawing*. Meskipun penelitian ini menggunakan durasi *thawing* yang berbeda (P1–P4), integritas membran terjaga bila rentang *thawing* masih dalam kondisi terkontrol.

Meskipun tidak ada perbedaan signifikan antar perlakuan, data hasil di atas menunjukkan bahwa protokol *thawing* yang digunakan (termasuk P4 dengan MPU tertinggi 93,65%) sangat efisien dalam mempertahankan integritas membran sel spermatozoa. Ini memberi keyakinan bahwa semen beku yang dihasilkan memiliki potensi fertilitas yang tinggi dan dapat diandalkan untuk program inseminasi buatan kerbau.

Tudung akrosom utuh adalah indikator penting dari kemampuan fertilisasi sperma kerbau setelah proses *thawing* karena keberadaan akrosom utuh esensial untuk melepaskan enzim yang diperlukan dalam penetrasi zona pelusida pada sel telur. Semakin tinggi persentase TAU, semakin besar peluang keberhasilan fertilisasi, baik lewat inseminasi alami maupun buatan (Arvioges *et al.*, 2021). Pengukuran TAU biasanya dilakukan dengan pewarnaan khusus untuk membedakan antara sperma dengan akrosom rusak dan masih utuh. Data yang diperoleh dari masing-masing perlakuan telah diolah dan disajikan dalam Tabel 6.

Berdasarkan tabel 6, hasil pengujian statistik menunjukkan bahwa antar perlakuan tidak berpengaruh nyata ($P>0,05$) terhadap TAU semen beku kerbau setelah *thawing*. Hasil ini menunjukkan bahwa meskipun analisis statistik tidak menunjukkan perbedaan signifikan antar perlakuan, nilai TAU di atas 85% pada P2, P3,

dan P4 menunjukkan bahwa protokol *thawing* yang digunakan cukup efektif dalam mempertahankan struktur akrosom dan tetap memenuhi standar inseminasi buatan (>80%). Temuan ini sejalan dengan ulasan oleh Sharafi et al., (2022), yang menunjukkan bahwa efektivitas *cryopreservasi* termasuk pengontrolan suhu *thawing* dan penggunaan *additive* pelindung membran lebih berperan dalam menjaga TAU daripada variasi waktu *thawing* ringan. Kondisi akrosom tetap stabil selama *thawing* yang tepat membantu mempertahankan kesiapan spermatozoa untuk fertilisasi.

Tabel 6. Rataan TAU Semen Beku Kerbau setelah *Thawing*.

Perlakuan	Rata-rata
P1	81,35 ± 8,58 ^{NS}
P2	86,32 ± 5,48 ^{NS}
P3	87,15 ± 7,63 ^{NS}
P4	85,98 ± 3,27 ^{NS}

Sumber: Data Penelitian 2025.

Penelitian oleh Solis et al. (2024) tentang metode *thawing* dan *thermal-resistance test* pada semen sapi juga menunjukkan bahwa *thawing* yang terkontrol (30–45 detik pada suhu 37–40°C) dapat mempertahankan parameter akrosom serta menstabilkan TAU di atas 80–85%.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan *thawing* dengan perlakuan waktu selama 30 detik, 60 detik, 90 detik dan 120 detik tidak berpengaruh nyata terhadap PTM (*Post-thawing motility*), viabilitas, abnormalitas, MPU (Membran Plasma Utuh) dan TAU (Tudung Akrosom Utuh) semen beku kerbau, sehingga *thawing* sampai 120 detik masih dapat dilakukan. Dengan demikian, *thawing* semen kerbau hingga 120 detik pada suhu 37°C dapat dilakukan tanpa menurunkan kualitas sperma, sehingga

memberikan fleksibilitas waktu dalam pelaksanaan IB di lapangan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kepala Balai, staf laboratorium, dan staf lapangan Inseminasi Buatan (BIB) Tuah Sakato, Ibh, Payakumbuh, Sumatera Barat, yang telah memberikan kesempatan penelitian di laboratorium BIB Tuah Sakato, Payakumbuh.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhter, S., Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., Iqbal, S., & Ullah, N. (2010). Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell® extender. *Theriogenology*, 74(6), 951-955.
- Ansari, M. S., Rakha, B. A., Andrabi, S. M. H., & Akhter, S. (2011). Effect of straw size and *thawing* time on quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Reproductive Biology*, 11(1), 69–74.
- Arvioges, Anwar, P., & Jiyanto. (2021). Efektifitas Suhu *Thawing* terhadap Keadaan Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) Spermatozoa Sapi Bali. *Jurnal Green Swarnadwipa*, 10(2): 342–350.
- Badan Litbang Pertanian (2020). *Laporan Tahunan Program Inseminasi Buatan pada Ternak di Indonesia*. Jakarta: Badan Litbang Pertanian.
- Badan Standardisasi Nasional. (2024). *Semen beku – Sapi (RSNI3-4869-1:2024)*. Jakarta: Badan Standardisasi Nasional.
- Dobrin, N., Zamfirescu, S., Coprean, D., & Anghel, A. H. (2014). Effect of thawing time and temperature variation on the quality of frozen-thawed ram semen. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(1), 8935–8941.

- Fafandri, M. I., Santoso, R., & Saputra, W. T. (2023). Kualitas Semen Beku Sapi Bali Pasca *Thawing* dalam Waktu Berbeda. *Jurnal Nukleus Peternakan*, 10(1), 60-66.
- Febriansyah, A., Trisunaryanti, N., Rofiqoh, N., & Suherman, H. (2024). Spermatozoa quality of Pasundan cattle frozen semen at various thawing temperatures and durations. *Jurnal Sain Peternakan Indonesia*, 19(1), 1–10. <https://ejournal.unib.ac.id/jspi/article/view/36927>
- Furi, E. R., & Arifiantini, I. (2013). *Pengujian keutuhan tudung akrosom sperma pada semen segar dan semen beku sapi*. Institut Pertanian Bogor.
- Ghirardosi, M. S., Fischman, M. L., Jorge, A. E., Chan, D., & Cisale, H. (2018). Relationship between morphological abnormalities in commercial bull frozen semen doses and conception rate. *Andrologia*, 50(3), 12884.
- Gurler, H., Malama, E., Heppelmann, M., Calisici, O., Leiding, C., Kastelic, J. P., & Bollwein, H. (2016). Effect of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. *Theriogenology*, 86(2), 562-571.
- Khalil, W. A., Elkhamy, S. A., Hegazy, M. M., Hassan, M. A., Abdelnour, S. A., & El-Harairy, M. A. (2025). The cryoprotective effects of celastrol nanoemulsion on post-thawed attributes and fertilizing ability of cryopreserved buffalo semen. *Veterinary Research Communications*, 49(4), 214.
- Manehat, F. X. (2021). Motilitas, viabilitas, abnormalitas spermatozoa dan pH semen sapi Bali dalam pengencer sari air tebu-kuning telur yang disimpan dalam waktu yang berbeda. *Disertasi*. Unuversitas Timor.
- Mehmood, S., Ahmed, H., Shah, S. A. H., Wattoo, F. H., Akhtar, S., & Andrabi, S. M. H. (2017). Determination of an optimal membrane-permeable cryoprotectant addition and dilution protocol for water buffalo spermatozoa. *CryoLetters*, 38(3), 239-249.
- Miraz, M. F. H., Deb, G., & Hossain, S. M. J. (2022). Motion characteristics and plasma integrity evaluation of Murrah buffalo semen.
- Mustofa, I., Susilowati, S., Suprayogi, T. W., Oktanella, Y., Purwanto, D. A., & Akintunde, A. O. (2022). Combination of nanoparticle green tea extract in tris-egg yolk extender and 39 °C thawing temperatures improve the sperm quality of post-thawed Kacang goat semen. *Animal Reproduction*, 19(4), e20220025. <https://doi.org/10.1590/1984-3143 AR2022-0025>
- Naz, S., Umair, M., Iqbal, S., et al. (2019). Ostrich Egg Yolk Improves Post-Thaw Quality and In Vivo Fertility of Nili-Ravi Buffalo (*Bubalus Bubalis*) Bull Spermatozoa. *Theriogenology*, 126, 140-144.
- Nicolae, D., Stela, Z., Dragomir, C., & Hortanase, A. A. (2014). Effect of *thawing* time and temperature variation on the quality of frozen-thawed ram semen. *Romanian Biotechnol. Lett*, 19, 8935-8940.
- Ozimic, S., Ban-Frangez, H., & Stimpfel, M. (2023). Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(6), 4716–4734.
- Patel, H. A., Siddiquee, G. M., Chaudhari, D. V., & Suthar, V. S. (2016). Effect of different antioxidant additives in semen diluent on cryopreservability (–196 °C) of buffalo semen. *Veterinary world*, 9(3), 299.

- Purwantara, B., Arifiantini, R. I., Said, S., & Rahayu, J. D. (2024). *Uji Integritas Membran Plasma Sperma Menggunakan Dua Metode yang Berbeda pada Semen Beku Kerbau Murrah*. Institut Pertanian Bogor (IPB).
- Putra, E., Khaeruddin, K., Armayanti, A. K., Farida, S., & Amin, S. (2022). Kualitas Spermatozoa Sapi Peranakan Limousin dalam Pengencer AndroMed yang Ditambahkan Berbagai Level Glukosa. *Musamus Journal of Livestock Science*, 5(1), 6-15.
- Rusco, G., Di Iorio, M., Gibertoni, P. P., Esposito, S., Penserini, M., Roncarati, A., Cerolini, S., & Iaffaldano, N. (2019). Optimization of Sperm Cryopreservation Protocol for Mediterranean Brown Trout: A Comparative Study of Non-Permeating Cryoprotectants and Thawing Rates In Vitro and In Vivo. *Animals*, 9(6), 304.
- Saini, M., Sheoran, S., Vijayalakshmy, K., Rajendran, R., Kumar, D., Kumar, P., & Yadav, P. S. (2020). Semen parameters and fertility potency of a cloned water buffalo (*Bubalus bubalis*) bull produced from a semen-derived epithelial cell. *Plos one*, 15(8), e0237766.
- Sansone, G., Nastri, M. J. F., & Fabbrocini, A. (2000). Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 55-76. <https://doi.org/10.1016/S0378>
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., Ahmed, H., & Qureshi, I. Z. (2017). Chicken egg yolk plasma in tris-citric acid extender improves the quality and fertility of cryopreserved water buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 89, 32-40.
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., & Qureshi, I. Z. (2016). Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*, 4(5), 972-976.
- Shahverdi, A., Rastegarnia, A., & Topraggaleh, T. R. (2014). Effect of extender and equilibration time on post thaw motility and chromatin structure of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Cell Journal (Yakhteh)*, 16(3), 279.
- Šimoník, O., Šichtař, J., Beran, J., Maňásková-Postlerová, P., Tůmová, L., Doležalová, M., Folková, P., Stádník, L., & Rajmon, R. (2019). Low density lipoprotein – important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Animal Reproduction*, 16(2), 267-276. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0107>
- Solís, J. M., Sevilla, F., Silvestre, M. A., Araya-Zúñiga, I., Roldan, E. R., Saborío-Montero, A., & Valverde, A. (2024). Effect of thawing procedure and thermo-resistance test on sperm motility and kinematics patterns in two bovine breeds. *Animals*, 14(19), 2768.
- Vale, W. G., Purohit, G. N., Miyasaki, M. Y., & Gaur, M. (2014). *Semen characteristics and artificial insemination in the buffalo*. *Bubaline Theriogenology*. G. N. Purohit (Ed.), 524-559.
- Wahid, H., & Rosnina, Y. (2011). Buffalo: Asia. Dalam Husbandry of Dairy Animals. In: Tulloh, N. M., & Holmes, J. H. G. (Eds.), *Buffalo Production in Subseries: Production – System Approach World Animal Science C6* (pp. 773-779). London: Elsevier.
- Yani, N. F., Elisia, R., Maiyontoni, Komala, R., & Meidita, F. (2025). Pengaruh Penambahan Beta Karoten dalam Pengencer Tris Kuning Telur terhadap Kualitas Semen Cair Kerbau Lumpur

(*Swamp Buffalo*). *Tropical Animal Science*,
7(1), 105–115.