

Penelitian

Karakteristik Semen dan Korelasi antara Konsentrasi Testosteron dengan Libido Pejantan Sapi Simental

(*Semen Characteristics and Correlation between Testosterone concentration with Libido of Simmental Bulls*)

Abdullah Baharun^{1,2}, Syahrudin Said³, R. Iis Arifiantini^{4*}, Ni Wayan K. Karja⁴

¹Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana, IPB University

²Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Djuanda

³Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong

⁴Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University

*Penulis untuk korespondensi: arifiantini@apps.ipb.ac.id

Diterima 27 April 2021, Disetujui 10 September 2021

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari karakteristik semen dan mengevaluasi hubungan antara konsentrasi testosteron dengan libido pejantan sapi Simental. Sebanyak 12 ekor sapi Simental, 9 ekor dengan motilitas spermatozoa $\geq 70\%$ (A) dan 3 ekor dengan motilitas spermatozoa $< 70\%$ (B) berdasarkan data sekunder dari Balai Inseminasi Buatan (BIB) tahun 2018-2019. Semen ditampung menggunakan vagina buatan pada pagi hari. Evaluasi kualitas semen segar hanya dilakukan dengan penilaian morfologi spermatozoa. Sampel darah disentrifugasi (3000 rpm, 10 menit), supernatan dimasukkan ke dalam *microtube* dan disimpan pada suhu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Analisis testosteron menggunakan metode ELISA. Data kualitas semen segar sapi pejantan Simental dianalisis secara deskriptif. Korelasi antara karakteristik semen, libido dan konsentrasi hormon testosteron menggunakan korelasi Pearson's. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan signifikan ($P < 0,05$) antara kualitas semen segar kelompok pejantan A dengan pejantan B dalam parameter motilitas, konsentrasi, dan morfologi spermatozoa normal. Volume semen dan skor libido pada semua pejantan tidak menunjukkan perbedaan signifikan. Konsentrasi testosteron pada kelompok pejantan A lebih tinggi (42,57 ng/mL) dibandingkan dengan kelompok pejantan B (33,26 ng/mL). Konsentrasi testosteron menunjukkan korelasi positif ($P < 0,01$) dengan karakteristik semen seperti motilitas spermatozoa (0,813), morfologi spermatozoa normal (0,639), dan libido (0,952). Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai pertimbangan untuk dilakukannya pengukuran konsentrasi testosteron dalam proses seleksi sapi jantan menjadi pejantan.

Kata kunci: testosteron, kualitas semen, libido, simmental, sapi pejantan

ABSTRACT

This study aimed to study the characteristics of semen and evaluate the relationship between testosterone concentration and libido in Simmental bulls. A total of 12 bulls, nine bulls with sperm motility $\geq 70\%$ (A) and three bulls with sperm motility $< 70\%$ (B) based on secondary data from Artificial Insemination Center (AIC) in 2018-2019. The semen was collected using an artificial vagina in the morning. Blood samples was then centrifuged at 3000 RPM for 10 minutes, supernatant was immediately transferred into a small tube and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Testosterone analysis was elucidated using ELISA method. Data on the quality of fresh semen of Simmental bulls were analyzed descriptively. Finally, correlations between semen characteristic, libido, and testosterone concentration were analyzed using Pearson's correlation analysis. The result showed a significant difference ($P < 0.05$) between fresh semen quality from male group A and B in terms of normal spermatozoa motility, concentration, and normal sperm morphology. Semen volume and libido scores in all bulls did not show significant differences. The testosterone concentration in group A was higher (42.57 ng/mL) compared to group B (32.26 ng/mL). It showed a positive correlation ($P < 0.01$) with semen characteristics such as sperm motility (0.813), normal spermatozoa morphology (0.639), and libido (0.952). The result of this study can be used as suggest for measuring the testosterone level in bulls' selection.

Keywords: testosterone, semen quality, libido, Simmental, bulls

PENDAHULUAN

Breeding Soundness Examination (BSE) adalah salah satu teknik yang digunakan untuk menyeleksi calon pejantan. Teknik BSE mudah dilakukan, dapat diulangi dan berkorelasi dengan kesuburan pejantan (Thundathil et al. 2016). Pengujian BSE menurut Hancock et al. (2016), meliputi tiga bagian, yaitu pengamatan fisik (meliputi pengamatan genitalia eksternal dan internal), pengukuran lingkaran skrotum, libido dan analisis kualitas semen. Penilaian kapasitas reproduksi sapi jantan terkadang hanya sebatas penilaian biometrika non organ reproduksi seperti pengukuran panjang badan, tinggi gumba, lebar kepala, panjang kepala, dan lingkaran pelvis (Singh et al., 2014). Biometrika organ reproduksi seperti lingkaran skrotum, panjang skrotum, maupun volume testis (Hedia et al., 2019) dan kualitas semen sudah sering dilaporkan, sedangkan libido kurang diperhatikan.

Libido adalah respons terhadap rangsangan endogen atau eksogen yang dimediasi melalui berbagai mekanisme fisiologis (Bryant 1989). Libido yang rendah pada sapi jantan merupakan salah satu masalah yang dihadapi di beberapa Balai Inseminasi Buatan (BIB). Ekspresi libido dimediasi oleh mekanisme hormonal terutama *luteinizing hormone* (LH) dan testosteron (Henney et al., 1990). Peningkatan testosteron berhubungan dengan karakteristik reproduksi primer maupun sekunder yang dapat meningkatkan sifat reproduksi pada ternak jantan.

Testosteron menurut Mandal et al., (2019) berhubungan langsung dengan fertilitas jantan mulai dari perkembangan reproduksi saat fetus, pubertas, spermatogenesis maupun mempertahankan libido. Testosteron berkorelasi positif dengan kualitas semen (Sajjad et al., 2007), meskipun korelasi rendah dengan motilitas spermatozoa (Souza et al., 2011). Kualitas semen antara lain ditunjukkan dengan morfologi spermatozoa normal yang tinggi. Morfologi spermatozoa antara lain dipengaruhi oleh hormon testosteron (Singh et al., 2014). Hormon testosteron diketahui berhubungan erat dengan libido dari jantan.

Simental merupakan salah satu sapi eksotik yang sangat diminati oleh peternak (Atul et al., 2020). Sapi Simental yang ada di BIB berasal dari pejantan impor ataupun hasil pembibitan milik pemerintah, seperti dari Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU), Padang Mengatas. Kajian hubungan konsentrasi testosteron dengan morfologi spermatozoa, dan libido sangat diperlukan, agar semen beku

yang diproduksi di BIB, berasal dari pejantan dengan libido yang tinggi dengan abnormalitas morfologi spermatozoa yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi hubungan antara konsentrasi testosteron dengan kualitas semen terutama dengan morfologi spermatozoa dan libido pejantan sapi Simental. Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan untuk seleksi calon pejantan sapi Simental di Indonesia.

MATERI DAN METODE

Semua prosedur dalam penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Komisi Etik Hewan, IPB University atas penggunaan hewan dengan nomor sertifikat: 158-2019 IPB. Sampel penelitian berdasarkan data sekunder kualitas semen segar sapi Simental tahun 2018-2019 dari BIB Lembang. Sapi Simental sebanyak 12 ekor dengan kisaran umur 3-4 tahun dengan motilitas spermatozoa $\geq 70\%$ (Kelompok A) sebanyak 9 ekor dan motilitas spermatozoa $< 70\%$ (Kelompok B) sebanyak 3 ekor. Sapi dipelihara sesuai dengan Standar Operasional Prosedur (SOP) pemeliharaan pejantan.

Pejantan dipelihara dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pemberian pakan berupa hijauan segar 10% ditambah konsentrat 1% per ekor dari bobot badan per hari dalam dua kali pemberian, pagi dan sore serta air minum diberikan secara *ad libitum*.

Analisis Kualitas Semen

Data sekunder kualitas semen segar secara makroskopis (volume, pH, warna, dan konsistensi) dan mikroskopis (motilitas spermatozoa dan konsentrasi spermatozoa). Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Olympus CX23). Perhitungan konsentrasi spermatozoa menggunakan fotometer SDM5. Data morfologi spermatozoa merupakan data primer. Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan sesuai SOP BIB Lembang.

Sampel untuk pengujian morfologi spermatozoa diperoleh dengan cara membuat preparat ulas campuran semen dengan NaCl fisiologis (1:4). Preparat ulas dikeringudarkan, diberi kode pejantan dan ditempatkan dalam *slide box*. Pewarnaan dan pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan di Laboratorium Unit Rehabilitasi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University. Pewarnaan sampel dilakukan dengan *carbolfuchsin* berdasarkan

metode Williams yang dikembangkan pada tahun 1920 dan dimodifikasi oleh Lagerlof tahun 1934 (Kavak *et al.*, 2004).

Protokol pewarnaan Williams dilakukan dengan cara: preparat ulas semen segar difiksasi menggunakan bunsen, dicuci dengan alkohol absolut selama 4 menit dan dikering udarakan. Preparat selanjutnya, dimasukkan ke dalam larutan choramin 0,5% selama 1-2 menit, sampai lendir (mukus) hilang dan ulasan terlihat jernih. Preparat dicuci dengan *distilled water*, alkohol 95% dan diwarnai dengan larutan *carbolfluchsineosin* selama 6 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Morfologi spermatozoa diamati dengan menggunakan mikroskop (Olympus CX23) dengan pembesaran 400 \times .

Pengamatan Libido

Libido pejantan dinilai selama koleksi semen dengan cara mencatat waktu kontak pertama dengan mulai menaiki *teaser* dan pertama kali *false mount* dengan protrusi penis (dalam detik). Peningkatan antusias selama *false mount* dan selama *service* berlangsung yang dinyatakan dalam skor 1-5 (Tabel 1).

Pengukuran Kadar Hormon Testosteron Koleksi dan Preparasi Darah

Darah dikoleksi sebanyak 3-5 ml menggunakan *disposable syringe* 5 ml yang mengandung EDTA (*three fingers, USA*®) melalui vena *coccygea* sapi. Darah kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 r.p.m., pada suhu ruang selama 10 menit. Plasma darah kemudian ditransfer ke dalam tabung mikro dan disimpan pada suhu -20 °C sampai dengan analisis testosteron.

Pengukuran Konsentrasi Testosteron

Analisis testosteron dilakukan menggunakan metode ELISA kit *Bovine testosterone* (Signalway antibody, #EK0019). Analisis ELISA dilakukan di Pusat Studi Satwa Primata (PSSP), IPB University. Plasma darah diencerkan dengan perbandingan 1:4 menggunakan *aquabidestilata*. Larutan standar dengan konsentrasi berkisar antara 0,2-16 ng/ml disiapkan. Sampel dan larutan standar ditransfer (masing-masing 25 μ l) ke dalam sumur *microplate ELISA*, kemudian ditambahkan dengan enzim konjugasi (kecuali blanko) dan ditutup dengan

cling film. Campuran dihomogenisasi menggunakan vortex selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit. Sumur *microplate* dicuci 3-4 kali dengan masing-masing 300 μ l larutan pencuci, ditambah dengan 200 μ l substrat, dan diinkubasi selama 15 menit (suhu ruang). Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ l *stop solution* pada setiap sumur. Absorbansi dibaca menggunakan *ELISA reader* pada 450 nm (Dasrul *et al.*, 2020).

Analisis Data

Data kualitas semen segar sapi pejantan Simental dianalisis secara deskriptif. Korelasi antara kualitas semen seperti volume semen, motilitas spermatozoa, morfologi spermatozoa, libido dan konsentrasi hormon testosteron menggunakan korelasi Pearson's. Perbedaan antar perlakuan, dilakukan analisis menggunakan *One-way ANNOVA*. Data dianalisis menggunakan *software SPSS* versi 20.

HASIL

Kualitas Semen Segar, Libido, dan Konsentrasi Testosteron

Kualitas semen segar dari 12 ekor sapi Simental menunjukkan volume rata-rata 4,87 ml, pH 6,7 dan berwarna putih susu sampai dengan krem dengan konsistensi yang sedang. Data mikroskopis menunjukkan motilitas spermatozoa rata-rata 67,20%, konsentrasi spermatozoa 883,21 \times 10⁶/ml, dan morfologi spermatozoa normal 88,16%. Volume semen dan libido pada kelompok pejantan A dan kelompok pejantan B tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($P > 0,05$). Motilitas, konsentrasi, dan morfologi spermatozoa normal berturut-turut pada kelompok pejantan A (70,39%, 1235,07 \times 10⁶ /mL, dan 95,20%) lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok pejantan B (64%, 731,35 \times 10⁶ /mL, dan 81,12%) (Tabel 2).

Skor libido pada semua pejantan tidak berbeda ($P > 0,05$), namun, konsentrasi testosteron pada kelompok pejantan A lebih tinggi (42,57 ng/mL) dibandingkan dengan kelompok pejantan B (33,26 ng/mL) (Tabel 2). Tinggi rendahnya konsentrasi testosteron pada setiap pejantan sapi Simental dipengaruhi oleh fisiologi kelenjar endokrin yang dapat mengindikasikan bahwa fungsi testis berjalan secara normal dan mempunyai pola tertentu.

Tabel 1 Respon libido sapi

Skor	Kriteria	Libido
1	Tidak ada respon untuk menaiki	Rendah
2	Mencoba menaiki, namun menggelincir kembali	
3	Mulai aktif menaiki	
4	Reaksi ketertarikan untuk kawin dan aktif menaiki dengan melakukan satu kali ejakulasi	Tinggi
5	Memperlihatkan reaksi ketertarikan untuk kawin dan aktif menaiki dengan melakukan lebih dari satu kali ejakulasi	

Hoflack et al., (2006)

Tabel 2 Kualitas semen segar dan konsentrasi testosteron pejantan sapi Simental

Parameter	Pejantan (rerata±SE)	
	Kelompok A (n=9)	Kelompok B (n=3)
Volume semen (mL)	5,37±0,28 ^a	4,37±0,30 ^a
Motilitas spermatozoa (%)	70,39±0,17 ^a	64,00±0,46 ^b
Konsentrasi spermatozoa (×10 ⁶ /mL)	1235,07±57,97 ^a	731,35±34,39 ^b
Morfologi spermatozoa normal (%)	95,20±0,21 ^a	81,12±0,25 ^b
Skor libido	5,00 ^a	4,80 ^a
Konsentrasi testosteron (ng/ml)	42,57±0,20 ^a	33,26±0,14 ^b

Huruf berbeda yang mengikuti angka pada baris yang sama, menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$); A = pejantan dengan kriteria motilitas spermatozoa $>70\%$; B = pejantan dengan kriteria motilitas spermatozoa $<70\%$.

Korelasi Testosteron dengan Karakteristik Semen dan Libido

Konsentrasi testosteron menunjukkan korelasi positif dengan dan libido pejantan sapi Simental. Hasil analisis menunjukkan adanya hubungan signifikan ($P < 0,01$) antara konsentrasi testosteron dengan karakteristik semen seperti motilitas spermatozoa (0,813), morfologi spermatozoa normal (0,639), dan libido (0,952) (Tabel 3). Hasil ini mengindikasikan bahwa hormon testosteron berperan penting dalam memengaruhi kualitas semen dan libido.

PEMBAHASAN

Semen segar sapi Simental tanpa memperhitungkan kelompok pejantan, menunjukkan kualitas yang normal sesuai dengan karakteristik sapi *Bos taurus* (Parthipan et al. 2017). Semen segar yang diproses menjadi semen beku harus memiliki motilitas spermatozoa $>70\%$

dan abnormalitas spermatozoa $<20\%$ (SNI nomor: 4869.1:2017; 10/Permentan/PK.210/3/2016). Berdasarkan ketentuan tersebut, nilai morfologi spermatozoa dalam penelitian ini seluruhnya memenuhi persyaratan untuk diproses menjadi semen beku.

Pejantan sapi Simental dengan motilitas spermatozoa $>70\%$ memiliki konsentrasi testosteron yang lebih tinggi dibandingkan dengan pejantan yang memiliki motilitas spermatozoa $<70\%$ (Tabel 2). Hasil penelitian ini sesuai dengan Rajak et al. (2014) pada sapi crossbred (Friesian Holstein×Tharparkar) dan Dasrul et al. (2020) pada sapi Aceh. Kedua peneliti tersebut menyatakan adanya hubungan antara konsentrasi testosteron dengan karakteristik semen (motilitas dan morfologi spermatozoa). Beberapa studi menunjukkan rendahnya kualitas semen berhubungan dengan defisiensi konsentrasi testosteron (Gulia et al., 2010).

Tingginya konsentrasi testosteron dalam penelitian ini berkorelasi ($P < 0,01$) dengan morfologi spermatozoa normal. *Gonadotropin rele-*

Tabel 3 Korelasi antara konsentrasi testosteron dengan libido, dan karakteristik spermatozoa

Parameter	Volume semen	Motilitas spermatozoa	Morfologi spermatozoa normal	Libido
Konsentrasi testosteron	0,150	0,813*	0,639*	0,952*

*korelasi signifikan ($P < 0,01$)

asing hormone (GnRH) yang disekresikan oleh hipotalamus merangsang disekresikannya *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) dari hipofisis anterior. Luteinizing hormone merangsang sel interstisial testis (sel Leydig) untuk menyekresikan androgen terutama testosteron. Testosteron yang disirkulasikan ke dalam darah akan menyebabkan perkembangan seks sekunder dan perkembangan serta pemeliharaan saluran reproduksi termasuk kelenjar vesikularis (Senger, 2012).

Produksi testosteron melalui konversi *dihydrotestosteron* dan estrogen dapat berdifusi ke dalam sel Sertoli, berikatan dengan *androgen receptor* (AR) untuk memulai respons fungsional yang diperlukan untuk mendukung spermatogenesis. Aktivitas FSH dapat memulai spermatogenesis dan merangsang sel Sertoli untuk menyintesis *androgen binding protein* (ABP) (Smith & Walker, 2014).

Testosteron merupakan hormon yang terlibat dalam spermatogenesis, terutama pada fase spermiogenesis pematangan spermatozoa (Souza et al., 2011). Hormon ini bekerja secara sinergis dengan FSH dan prolaktin. Adanya interaksi antara LH dengan reseptornya akan mengaktifkan sistem adenil siklase, termasuk aktivasi protein kinase dan sintesis *ribonucleic acid* (RNA) (Shupe 2011), sehingga terjadi peningkatan sintesis pregnenolon dengan jumlah rantai karbon 21 (C₂₁) dari kolesterol (C₂₇) oleh mitokondria sel-sel Leydig. Hasil akhir dari proses tersebut adalah terbentuknya testosteron (C₁₉) (Shupe et al., 2011) yang dapat memengaruhi proses spermatogenesis maupun berhubungan kualitas semen (Rajak et al., 2014).

Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi spermatozoa kelompok sapi pejantan B lebih rendah dibandingkan dengan kelompok pejantan A ($P < 0,05$). Hal ini kemungkinan berkaitan dengan rata-rata volume semen yang diperoleh kelompok sapi pejantan B lebih sedikit meskipun tidak berbeda secara signifikan ($P > 0,05$). Spermatozoa pada saat ejakulasi akan bercampur dengan plasma

yang berasal dari kelenjar aksesoris. Sekresi kelenjar aksesoris ini yang dapat memengaruhi tinggi maupun rendahnya volume semen. Peningkatan volume semen dikaitkan berhubungan dengan konsentrasi spermatozoa (Senger, 2012). Murphy et al. (2018) melaporkan adanya hubungan antara volume semen dengan konsentrasi spermatozoa pada sapi Friesian Holstein. Perbedaan volume semen dan konsentrasi spermatozoa berhubungan dengan umur, *breed*, interval penampungan, kondisi pejantan dan faktor lingkungan (Hafez 2000).

Motilitas spermatozoa (<70%) pada pejantan sapi Simental dalam penelitian ini menunjukkan hasil yang lebih rendah dibandingkan dengan laporan Sabés-Alsina et al. (2019) (Tabel 2). Menurunnya motilitas spermatozoa memungkinkan berhubungan dengan kelainan abnormalitas sekunder dan tersier yang umumnya terdapat pada bagian ekor spermatozoa (Ax et al., 2000). Abnormalitas sekunder dan tersier dapat terseleksi pada saat penilaian motilitas dan gerakan individu. Abnormalitas spermatozoa yang bersifat primer seperti *microcephalus*, *pearshape*, dan *narrow at the base* mempunyai gerakan motilitas yang normal (Nagy et al., 2013).

Kemampuan spermatozoa untuk membuahi sel telur (Morrell & Rodriguez-Martinez 2009) harus hidup, motil (bergerak maju progresif), mempunyai morfologi yang normal dengan kromatin/Deoxyribonucleic acid (DNA) yang utuh dan baik. Spermatozoa yang motil tidak semua mempunyai bentuk yang normal dan mempunyai kromatin yang baik. Oleh karena itu hanya spermatozoa yang hidup, motil dan morfologi normal serta kromatin utuh yang mampu untuk membuahi sel telur (Nagy et al., 2013). Motilitas spermatozoa dan morfologi spermatozoa merupakan aspek penting dalam menentukan fertilitas pejantan atau keberhasilan fertilisasi (Mandal et al., 2010).

Eksresi libido dimediasi oleh mekanisme hormonal terutama LH dan testosteron. Hasil analisis menunjukkan adanya korelasi signifikan

antara testosteron dengan skor libido. Hasil ini sejalan dengan laporan Mandal et al. (2019) yang mendapatkan sapi Zebu jantan dengan libido tinggi menunjukkan sekresi testosteron yang tinggi pula. Hasil analisis menunjukkan skor libido tinggi pada semua kelompok sapi Simental, meskipun konsentrasi testosteron berbeda signifikan pada masing-masing kelompok pejantan. Sapi Simental dengan motilitas <70% meskipun menunjukkan perbedaan konsentrasi testosteron (Tabel 2), akan tetapi hasil tersebut masih normal. Testosteron perifer pada sapi jantan normal, berkisar dari 2-20 ng/mL (Katongole et al., 1971) dan tingkat ambang testosteron tersebut diperlukan untuk mempertahankan libido normal pada sapi (Blockey & Galloway 1978).

Hasil penelitian ini menjadi pertimbangan dalam proses seleksi sapi jantan menjadi pejantan, yang masih perlu adanya kombinasi pengukuran testosteron dengan parameter kualitas semen dan parameter kualitas fisik (Singh et al., 2014). Sekresi konsentrasi testosteron berkorelasi dengan karakteristik semen seperti motilitas spermatozoa, morfologi spermatozoa normal, dan skor libido pada pejantan sapi Simental.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh DIKTI melalui Beasiswa Pendidikan Pascasarjana Dalam Negeri (BPPDN), hibah Penelitian Disertasi Doktor (PDD) (Nomor Kontrak: 1/E1/KP.PTNBH/2020 dan 1/AMD/E1.KP.PTNBH/2020, tahun 2020), dan Direktorat Riset dan Pengabdian Kepada Masyarakat (DPRM) Universitas Djuanda Bogor (Nomor: 094/LPPM/K-VII/2020), untuk itu kami ucapkan terima kasih. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada USAID-Sustainable Higher Education Research Alliances (SHERA) through Collaborative Research Animal Biotechnology and Coral Reef Fisheries (CCR ANBIOCORE) atas dukungannya untuk testosteron ELISA kits. Kami juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya untuk Balai Inseminasi Buatan (BIB) Lembang yang telah mengizinkan penelitian ini dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- [BSN] Badan Standardisasi Nasional. Semen beku sapi. SNI 4869.1:2017.
- [Permentan] Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia. 2016. Penyediaan dan peredaran semen beku ternak ruminansia nomor: 10/Permentan/PK.210/3/2016. Jakarta: Kementan.
- Atul A, Maulana T, Kaiin EM, Purwantara B, Arifiantini RI, Memili E. 2020. Comparative analysis of various step-dilution techniques on the quality of frozen Limousin bull semen. *Veterinary World*. 13(11): 2422-2428. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.13/November-2020/18.html>.
- Ax RL. 2000. Semen evaluation. Di dalam: Hafez ESE, Hafez B. editor. *Reproduction in Farm Animal*. 7th ed. USA: Lippincot Williams dan Wilkins.
- Blockey MA, Galloway DB. 1978. Hormonal control of serving capacity in bulls. *Theriogenology*. 9: 143-151. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0093691X78901450>.
- Bryant DG. 1989. The ecological basis of behavior. *Applied Animal Behaviour Science*. 22: 215-224. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(89\)90055-5](https://doi.org/10.1016/0168-1591(89)90055-5).
- Dasrul D, Wahyuni S, Sugito S, Hamzah A, Zaini Z, Haris A, Gholib. 2020. Correlation between testosterone concentration with scrotal circumference, and semen characteristic in Aceh bulls. *E3s Web of Conferences (1st ICVAES 2019)* 151: 1-5.
- Gulia S, Sarkar M, Kumar V, Meyer HHD, Prakash BS. 2010. Divergent development of testosterone secretion in male zebu (*Bos indicus*) and crossbred cattle (*Bos indicus* × *Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) during growth. *Tropical Animal Health Production*. 42: 1143-1148. doi: 10.1007/s11250-010-9538-x
- Hafez ESE. 2000. *Anatomy of Male Reproduction*. *Farm Animal*. 7th Ed. Hafez ESE, Hafez B, editor. Blackwell Publishing: 431-442.
- Hancock AS, Younis PJ, Beggs DS, Mansell PD, Stevenson MA, Pyman MF. 2016. An Assessment of dairy herd bulls in southern Australia: 1. Management practices and bull breeding soundness evaluations. *Journal Dairy Science*. 99: 1-5. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216306932>.
- Hedia MG, El-Belely MS, Ismail ST, Abo El-Maaty AM. 2019. Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular volume, plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams. *Theriogenology*. 123: 68-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.09.032.

- Henney SR, Killian GJ, Deaver DR. 1990. Libido, hormone concentrations in blood plasma and semen characteristics in Holstein bulls. *Journal Animal Science*. 68: 2772–2784. doi: 10.2527/1990 .6892784x.
- Hoflack G, Van Soom A, Maes D, Dekruif A, Opsomer G, Duchateau L. 2006. Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holstein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. *Theriogenology*. 66(2): 207–216. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.11.003.
- Kavak A, Lundeheim N, Aidinik M, Einarsson S. 2004. Sperm morphology in Estonian and tori breed stallions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 45: 11–18. <https://actavetscand.biomedcentral.com/articles/10.1186/1751-0147-45-11>.
- Katongole CB, Naftolin F, Short RV. 1971. Relationship between blood levels of luteinising hormone and testosterone in bulls, and the effects of sexual stimulation. *Journal Endocrinology*. 50: 457–466. doi: 10.1677/joe.0.0500457.
- Mandal DK, Kumar M, Tyagi S. 2010. Effect of age on spermogram of Holstein Friesian × Sahiwal crossbred bulls. *Journal Animal Bioscience*. 4(4): 595–603. doi: 10.1017/S1751731109991273
- Mandal S, Bhakat M, Singh A, Mohanty TK, Abdullah M. 2019. Libido problem is untraceable through testosterone and luteinizing hormone rhythm in Zebu breeding bulls. *Journal of Animal Health and Production*. 7(3): 81–84. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731109991273>.
- Morrell JM, Rodriguez-Martinez H. 2009. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: A review. *Journal Andrology*. 1: 1-9. DOI: 10.2174/1876827X00901010001
- Murphy EM, Kelly AK, O’Meara C, Eivers B, Lonergan P, Fair S. 2018. Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre. *Journal Animals Science*. 96(6): 2408–2418. doi: 10.1093/jas/sky130.
- Nagy S, Johannisson A, Wahlsten T, Ijäs R, Andersson M, Rodriguez-Martinez H. 2013. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. *Theriogenology*. 79: 1153–1161. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.011
- Parthipan S, Selvaraju S, Somashekar L, Arangasamy A, Sivaram M, Ravindra JP. 2017. Spermatozoal transcripts expression levels are predictive of semen quality and conception rate in bulls (*Bos taurus*). *Theriogenology*. 98: 41–49. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.04.042
- Rajak SK, Kumaresan A, Gaurav MK, Layek SS, Mohanty TK, Aslam MKM, Tripathi UK, Prasad S, De S. 2014. Testicular cell indices and peripheral blood testosterone concentrations in relation to age and semen quality in crossbred (Holstein Friesian × Tharparkar) bulls. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 27(11): 1554–1561. doi: 10.5713/ajas.2014.14139
- Sabés-Alsina M, Lundeheim N, Johannisson A, López-Béjar M, Morrell MJ. 2019. Relationships between climate and sperm quality in dairy bull semen: A retrospective analysis. *Journal Dairy Science*. 102: 1-11. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219302838>.
- Sajjad MS, Ali N, Ullah M, Anwar S, Akhter, Andrabi SMH. 2007. Blood serum testosterone level and its relationship with scrotal circumference and semen characteristics in nili-ravi buffalo bulls. *Pakistan Veterinary Journal*. 27(2): 63–66. http://www.pvj.com.pk/Abstract/27_2/2.htm.
- Senger PL. 2012. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 3rd (third) rev. ed. Washington (US): Current Conception, Inc. Redmond, OR.
- Shupe J, Cheng J, Puri P, Kostereva N, Walker WH. 2011. Regulation of Sertoli-Germ cell adhesion and sperm release by FSH and nonclassical testosterone signaling. *Molecular Endocrinology*. 25(2): 238-252. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386539/>.
- Singh A, Brar P, Cheema R. 2014. Relationships among frozen-thawed semen fertility, physical parameters, certain routine sperm characteristics and testosterone in breeding Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls. *Veterinary World*. 7(9): 644-651. <http://www.veterinaryworld.org/Vol.7/September-2014/3.html>
- Smith LB, Walker WH. 2014. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell Developmental Biology*. 1: 2–13.
- Souza LWO, Andrade AFC, Celehini ECC, Negrao JA, deArruda RP. 2011. Correlation between sperm characteristics and testosterone in bovine seminal plasma by direct radioimmunoassay. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 40(12): 2721–2724. https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982011001200015.
- Thundathill JC, Dance AL, Kastelic JP. 2016. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. *Theriogenology*. 86(1): 397–405. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.054>.