



**STUDI TENTANG PENGENCER KUNING TELUR DAN
PENGARUHNYA TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU
SAPI JAWA BREBES**

(Study on egg yolk diluents and its effect on semen quality in Java cattle)

W.D. Permatasari, E.T. Setiatin, dan D. Samsudewa
Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect diluent egg yolk toward quality of frozen semen of Java cattle. This research used Completely Randomized Design (CRD), each treatment was repeated 6 times consisted of 4 treatments those were T₀ = diluents without egg yolks; T₁ = 5%, T₂ = 10%, T₃ = 15%. Data analysis preparing with normality and homogeneity testing, when the data was normal and homogeneous will be followed by analysis of variance (ANOVA). If the resulting data is not normal and is not homogeneous so then be analyzed by non-parametric statistics, namely Kruskal-Wallis H-Test. The result showed average of semen quality before freezing T₀; T₁; T₂; T₃ for motility 40, 37,5; 43,3 and 38,3%; live percentage 23,52; 24,07; 33,67 and 25,51%; sperm abnormality 18,27; 21,27; 18,81 and 14,69%, respectively. Average of *post thawing* T₀; T₁; T₂; T₃ for motilitas 6,25; 4,17; 5,42 and 4,58; live sperm percentage 15,85; 12,18; 13,30 and 16,75%; sperm abnormality 17,08; 13,15; 10,5 and 16,28%, respectively. Supplementation up to 15% of egg yolk in extender was not affected to semen quality.

Key words: frozen semen quality, diluent of skim egg yolk, Java cattle.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengencer kuning telur terhadap kualitas semen beku sapi Jabres. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), setiap perlakuan diulangi 6 kali terdiri dari 4 perlakuan yaitu T₀= Pengencer tanpa kuning telur; T₁= 5%; T₂= 10%; T₃= 15%. Analisis data diawali dengan uji normalitas dan homogenitas, apabila data normal dan homogen dilanjutkan dengan *analysis of variance* (ANOVA). Apabila dihasilkan data yang tidak normal dan tidak homogen maka akan dianalisis dengan statistik non-parametrik yaitu Kruskal-Wallis H-Test. Berdasarkan hasil penelitian rata-rata hasil pengamatan pada saat *before freezing* T₀; T₁; T₂; T₃ untuk motilitas yaitu 40; 37,5; 43,3 dan 38,3%; persentase hidup yaitu 23,52; 24,07; 33,67 dan 25,51%; serta abnormalitas 18,27; 21,27; 18,81; dan 14,69%. Rata-rata hasil pengamatan pada saat *post thawing* T₀; T₁; T₂; T₃ untuk motilitas yaitu 6,25; 4,17; 5,42 dan 4,58%; persentase hidup yaitu 15,85; 12,18; 13,30; dan 16,75%; serta abnormalitas 17,08; 13,15; 10,5; dan 16,28%. Hasil analisis menunjukkan tidak adanya perbedaan kualitas antar perlakuan persentase kuning

telur. Jadi dapat disimpulkan penambahan kuning telur sampai 15% dalam pengencer skim kuning menghasilkan kualitas semen yang relatif sama.

Kata kunci: kualitas semen beku, pengencer skim kuning telur, sapi Jawa.

PENDAHULUAN

Sapi Jawa Brebes (Jabres) merupakan plasma nutfah sapi lokal sehingga pengembangannya harus ditingkatkan. Masalah yang paling utama pada perkembangan sapi Jabres adalah keterbatasan pejantan unggul serta masih terjadinya perkawinan silang dengan bangsa lain karena masih dipelihara secara *umbaran*. Pemeliharaan secara *umbaran* akan menyebabkan perkawinan alam yang tidak terkontrol dan kemungkinan perkawinan silang dengan bangsa lain. Salah satu upaya peningkatan populasi sapi Jabres sekaligus usaha menjaga kemurniannya yaitu melalui penerapan teknologi inseminasi buatan (IB).

Pengencer yang digunakan yaitu skim (*buffer*) kuning telur. *Buffer* berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dan juga berfungsi menetralkan asam laktat yang dihasilkan dari sisa metabolisme, sehingga *buffer* diharapkan mempunyai kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah dalam konsentrasi yang tinggi (Steinbach dan Foote, 1967 disitasi oleh Arifiantini *et al.*, 2005). Kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Kuning telur umumnya ditambahkan ke dalam pengencer semen sebagai sumber energi, agen protektif dan dapat memberikan efek sebagai penyangga terhadap sperma (Walson and Martin, 1975 disitasi oleh Siswanto, 2006). Kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Kuning telur juga mengandung glukosa, vitamin yang larut dalam air dan larut dalam lemak sehingga menguntungkan spermatozoa (Djanuar, 1985).

Pada semen sapi Jawa belum ada penelitian tentang pengencer kuning telur, sehingga penelitian ini sangat perlu dilakukan. Penambahan persentase kuning telur sebesar 5, 10 dan 15% pada penelitian ini dikarenakan pada penelitian sebelumnya Deka dan Rao (1986) menyatakan bahwa penambahan kuning telur sebesar 20% dapat memberikan persentase motilitas paling baik.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pengencer kuning telur terhadap kualitas semen beku sapi Jabres. Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai persentase kuning telur yang tepat dalam pengencer skim kuning telur yang mempunyai kualitas semen beku yang tinggi untuk pelaksanaan inseminasi buatan pada sapi Jawa Brebes.

MATERI DAN METODE

Materi yang akan digunakan dalam penelitian yaitu semen yang ditampung dari 4 ekor pejantan sapi Jabres yang dipelihara oleh Kelompok Tani Ternak Cikoneng Sejahtera. Bahan yang digunakan meliputi susu skim, kuning telur,

glukosa, gliserin, aquabidest, eosin 0,2%, dan antibiotik. Peralatan yang digunakan meliputi vagina buatan untuk proses penampungan semen, kandang penjepit betina, water heater, tambang, tabung berskala untuk mengetahui volume semen yang didapatkan, kertas lakmus untuk mengetahui derajat keasaman, *haemocytometer* untuk menghitung konsentrasi, mikroskop untuk melihat motilitas, *object glass*, *deck glass*, dan bunsen untuk evaluasi semen dan pemeriksaan persentase hidup mati dan abnormalitas spermatozoa, gelas beaker, kertas saring, dan gelas ukur untuk membuat pengencer semen, kulkas, *stopwatch*, *straw*, rak *straw*, kateter, *sterofom box*, *container*, dan alat tulis untuk mencatat hasil yang didapatkan.

Metode yang digunakan dalam pengumpulan data terdiri dari 6 tahapan, yaitu:

- a. Tahap persiapan penampungan yaitu mempersiapkan vagina buatan, mempersiapkan pejantan dan betina, melakukan *teasing* atau perangsangan.
- b. Tahap persiapan pengencer semen yaitu menyiapkan pengencer skim kuning telur. Menimbang bahan-bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan pengencer dan memisahkan kuning telur dengan putih telur, bahan-bahannya adalah susu skim, gliserol, glukosa, antibiotik, dan kuning telur dengan perbandingan persentase volume 5%, 10% dan 15%.
- c. Tahap penampungan yaitu mengamati dan melakukan proses penampungan pada pagi hari setiap satu minggu sekali selama enam minggu.
- d. Tahap evaluasi semen segar, melakukan pemeriksaan makroskopis meliputi pH, volume, warna, bau, konsistensi semen, dan pemeriksaan mikroskopis meliputi konsentrasi, motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa.
- e. Tahap Pengenceran, membagi 4 bagian semen yang berkualitas baik, 1 bagian tidak diencerkan dan 3 bagian diencerkan menggunakan pengencer skim kuning telur dengan persentase masing-masing kuning telur 5%, 10% dan 15%.
- f. Tahap pengumpulan data. Parameter yang digunakan yaitu motilitas, persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa diukur dengan cara meneteskan semen dibagian tengah pada *object glass* kemudian ditutup dengan *deck glass* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x10. Pemeriksaan persentase hidup dan abnormalitas spermatozoa, diawali dengan meneteskan 1 tetes eosin 0,2% diatas gelas objek, kemudian menambahkan 1 tetes semen yang dicampur dengan ujung gelas objek yang lain. Kemudian membuat preparat apus dan memanaskannya diatas bunsen. Preparat tersebut diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40x10. Jumlah sperma yang diamati makin banyak makin baik, minimal 200 spermatozoa.

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 macam perlakuan dan 6 kali ulangan. Analisis data diawali dengan uji normalitas dan homogenitas, apabila data normal dan homogen dilanjutkan dengan *analysis of variance* (ANOVA) menggunakan *software* SAS

versi 9.13 *portable*. Apabila dihasilkan data yang tidak normal dan homogeny maka akan dianalisis dengan statistik non-parametrik yaitu Kruskal-Wallis H-Test menggunakan *software* SPSS versi 16.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar

Pemeriksaan makroskopis semen sapi Jabres (n=4 ekor) mempunyai nilai rata-rata untuk masing-masing pemeriksaan adalah volume semen $5,7 \pm 3,07$ ml/ejakulasi sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (2000) yang menyatakan bahwa volume semen sapi berkisar antara $5,7 \pm 3,07$ ml/ejakulasi. Konsistensi encer-sedang tidak sesuai dengan hasil penelitian Solihati *et al.*, (2008) bahwa konsistensi semen sapi adalah sangat kental. Warna semen putih susu-krem, menurut Toelihere (1985) semen yang normal berwarna seperti air susu, krem keputihan dan keruh. Derajat keasaman (pH) $6,7 \pm 3,10$ masih berada dalam kisaran pendapat Saili *et al.* (2008) bahwa pH rata-rata sapi Peranakan Ongole adalah 6,5 dengan kisaran 5-7.

Tabel 1. Kualitas Semen Segar Sapi Jabres

Kualitas semen	Rata-rata
Volume (ml)	$5,7 \pm 3,07$
pH	$6,7 \pm 3,10$
Konsistensi	Encer-sedang
Warna	Putih susu-krem
Bau	Spermin
Gerak massa	2,2 (++)
Motilitas (%)	$70 \pm 5,48$
Konsentrasi	$1607 \pm 1142,92$
Persentase hidup (%)	$79,35 \pm 10,37$
Abnormalitas (%)	$13,27 \pm 7,09$

Kualitas rata-rata semen sapi Jabres secara mikroskopis berupa gerakan massa adalah 2,2 setara dengan (++) , konsentrasi 1607×10^6 , persentase hidup $79,35\% \pm 10,37$, kondisi ternak dan lingkungan sangat berpengaruh terhadap kualitas semen. Hal ini sesuai dengan pendapat Arifiantini *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa pada sapi lokal lainnya seperti sapi Bali diperoleh data rata-rata kualitas semen segar secara mikroskopis yaitu gerakan massa 2,7 setara dengan (++)/+++), persentase hidup spermatozoa 62,62-76,21% dan konsentrasi sebesar 1.340×10^6 spermatozoa/ml. Motilitas $70\% \pm 5,48$ berada dalam kisaran pendapat Hafez (2000) yaitu antara 50-80% dengan rata-rata 65%. Abnormalitas berada dibawah 20% (Toelihere, 1993) yaitu $13,27\% \pm 7,09$ menunjukkan bahwa kualitas semen pada kisaran normal dan layak untuk diproses lebih lanjut dan semen berada dalam kisaran 5-15% (Dahmani, 2011) yang berarti semen sapi Jabres berkualitas tinggi.

Pengaruh Berbagai Persentase Kuning Telur terhadap Motilitas Spermatozoa *Before Freezing* dan *Post Thawing* sapi Jawa Brebes

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh data rata-rata motilitas *before freezing* spermatozoa tertinggi pada persentase kuning telur 0% dan 10% sebesar $\geq 40\%$ (Zenichiro *et al.*, 2002), namun untuk keseluruhan lebih rendah dari Standar Operasional Pelayanan BIB Sidomulyo Ungaran (2011), yaitu motilitas pada tahapan pengolahan *before freezing* mempunyai nilai lebih dari 50%. Arifiantini dan Yusuf (2004) menyatakan bahwa motilitas pada tahapan *pasca equilibrasi* sebesar 72,25%.

Motilitas yang diperoleh saat *post thawing* lebih rendah dari 46,36% (Arifiantini *et al.*, 2005), dan 40% (Garner dan Hafez, 2000). Penurunan motilitas dari tahapan pengolahan *before freezing* ke tahapan *post thawing* sebesar 33,33-37,88% dan masih berada pada kisaran 10-40% (Parrish's 2003 yang disitasi oleh Arifiantini dan Yusuf, 2004) hal ini dikarenakan adanya peningkatan asam laktat secara alamiah. Motilitas *post thawing* pada pengencer tanpa kuning telur menghasilkan motilitas yang lebih tinggi dibandingkan pengencer dengan persentase kuning telur 10%. Hal ini dikarenakan pada pengencer dengan persentase kuning telur 0% mempunyai kandungan *leistin dan lipoprotein* yang sama dengan pengencer yang menggunakan kuning telur (Steinbach dan Foote, 1967). Tanpa penambahan kuning telur mengakibatkan butiran-butiran lemak yang terdapat dalam pengencer berkurang, sehingga konsumsi energi yang dikeluarkan spermatozoa untuk bergerak berkurang serta asam laktat yang dihasilkan lebih sedikit dibandingkan dengan spermatozoa yang diberi pengencer dengan menggunakan kuning telur. Semakin tinggi kandungan asam laktat maka kecepatan spermatozoa dalam bergerak semakin menurun, bahkan tidak bergerak akibat rusaknya membran plasma (Setyaningsih, 2012).

Tabel 2. Rata-rata Motilitas Pada Tahapan Pengolahan *Before Freezing* dan *Post Thawing*

Persentase Kuning Telur	Tahapan Pengolahan Semen Beku	
	<i>Before Freezing</i>	<i>Post Thawing</i>
	-----%-----	
0	40,0 ± 17,88	6,25 ± 7,37
5	37,5 ± 18,09	4,17 ± 8,01
10	43,3 ± 25,42	5,42 ± 6,78
15	38,3 ± 21,13	4,58 ± 6,78

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa saat *before freezing* dan *post thawing* tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) terhadap keempat perlakuan persentase kuning telur (Lampiran 7). Hal ini dikarenakan pada perlakuan persentase kuning telur selisih persentasenya tidak

terlalu jauh dan masih dibawah 20% (Toelihere, 1993) sehingga nutrisi dan sumber energi yang diberikan pada spermatozoa tidak berlebih dan akan menghasilkan motilitas yang tidak berbeda. Menurut Deka dan Rao (1986) bahwa penambahan kuning telur sebesar 20% dapat memberikan persentase motilitas paling baik.

Pengaruh Berbagai Persentase Kuning Telur terhadap Persentase Hidup Spermatozoa *Before Freezing* dan *Post Thawing* Sapi Jawa Brebes

Persentase hidup pada saat *before freezing* tertinggi pada pengencer dengan persentase kuning telur 10% dan pada saat *post thawing* tertinggi pada pengencer dengan persentase kuning telur 15%. Hasil tersebut dipengaruhi oleh tahapan-tahapan pengolahan antara lain berhubungan dengan udara terlalu lama (Toelihere, 1985). Selain itu semakin besar persentase kuning telur maka jumlah lemak kuning telur juga semakin besar sehingga menghalangi pergerakan spermatozoa dan membuat spermatozoa lebih aktif untuk melewati butiran-butiran lemak kuning telur sehingga lebih cepat mengalami peningkatan konsumsi energi akibat berkurangnya sumber makanan bagi spermatozoa dan menumpuknya asam laktat. Tingginya kandungan asam laktat ini menyebabkan banyak spermatozoa yang mati/ tidak bergerak dan menurunnya kecepatan akibat rusaknya membran (Setyaningsih, 2012). Sperma yang hidup tidak atau sedikit menghisap warna dan spermatozoa yang mati akan menghisap warna lebih banyak, hal ini dikarenakan permeabilitas dinding sel meningkat pada saat sperma mati (Hafez, 2000).

Tabel 3. Rata-rata Persentase Hidup Pada Tahapan Pengolahan *Before Freezing* dan *Post Thawing*

Persentase Kuning Telur	Tahapan Pengolahan Semen Beku	
	<i>Before Freezing</i>	<i>Post Thawing</i>
	-----%-----	
0	23,52 ± 15,65	15,85 ± 13,23
5	24,07 ± 27,94	12,18 ± 5,82
10	33,67 ± 30,65	13,30 ± 4,16
15	25,51 ± 23,72	16,75 ± 5,39

Hasil yang diperoleh saat *post thawing* sangat rendah dikarenakan perbedaan kondisi membran pada saat pembekuan dan proses pencairan kembali. Menurut Suprayogi (1996) perubahan ini mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran sehingga terjadi lisis dan kematian. Proses pembekuan terbentuk kristal- kristal es dan terjadi penumpukan elektrolit dan bahan-bahan terlarut lainnya. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding spermatozoa dan waktu pencairan kembali permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. Permukaan

spermatozoa dibungkus oleh suatu membran lipoprotein, apabila spermatozoa mati permeabilitas membran meningkat terutama di daerah pangkal kepala dan hal ini merupakan dasar pewarnaan spermatozoa hidup dan mati (Toelihere, 1985). Persentase hidup spermatozoa lebih tinggi daripada motilitas, hal ini dikarenakan sperma yang hidup belum tentu dapat bergerak, namun sperma yang tidak bergerak terkadang masih hidup (Campbell *et al.* 2003).

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase hidup spermatozoa saat *post thawing* tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap keempat perlakuan persentase kuning telur (Lampiran 10). Hal ini dikarenakan penggunaan susu skim pada bahan pengencer mengakibatkan peningkatan dalam menetralkan sisa metabolisme akibat aktifitas spermatozoa, sehingga banyak spermatozoa yang mati (Djanuar, 1985). Selain itu penggunaan waktu *thawing* yang sama tidak memberikan hasil persentase hidup yang berbeda. Menurut Witarsa (2001) menyatakan bahwa semakin lama waktu *thawing* maka tingkat kematian spermatozoa akan meningkat.

Pengaruh Berbagai Persentase Kuning Telur terhadap Abnormalitas Spermatozoa *Before Freezing* sapi Jawa Brebes

Tabel 4. Rata-rata Abnormalitas Pada Tahapan Pengolahan *Before Freezing* dan *Post Thawing*

Persentase Kuning Telur	Tahapan Pengolahan Semen Beku	
	<i>Before Freezing</i>	<i>Post Thawing</i>
	-----%-----	
0	18,27 ± 8,15	17,08 ± 4,72
5	21,27 ± 10,16	13,15 ± 3,94
10	18,81 ± 8,16	10,50 ± 2,36
15	14,69 ± 9,10	16,28 ± 5,76

Hasil tersebut dapat dikategorikan bahwa kualitas semen pada tahapan *before freezing* dan *post thawing* sedang. Hal ini sesuai dengan pendapat Dahmani (2011), berada dibawah kisaran Bearden dan Fuquay (2000) 20-25% yang berarti fertilitas tidak akan terganggu dan dapat digunakan untuk program IB (Toelihere, 1993) sehingga semen tersebut layak untuk dibekukan.

Berdasarkan hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase hidup spermatozoa saat *before freezing* tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap keempat perlakuan persentase kuning telur (Lampiran 12). Toelihere (1993) menyatakan bahwa fungsi kuning telur ayam terletak pada kandungan *lipoprotein* dan *lecithinnya* yang dapat bekerja mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel sperma terutama selama proses pembekuan dan pencairan kembali. Lipoprotein akan melindungi sperma dari luar sel yaitu dengan jalan meletakkan diri pada membrane plasma sperma sehingga sperma terbungkus oleh lipoprotein. lipoprotein adalah komponen utama di dalam kuning telur yang mempunyai daya tarik menarik dengan membrane plasma sperma. Tidak adanya

perbedaan pada keempat perlakuan dapat dipengaruhi oleh penanganan yang salah saat pembuatan preparat ulas, pendinginan dan pemanasan kembali akan merusak lipoprotein yang ada pada membrane plasma, sehingga dapat terjadi keabnormalan yang disebut keabnormalan tersier (Hafez and Hafez, 2000).

KESIMPULAN

Penambahan kuning telur 0-15% dalam pengencer skim kuning mempunyai kandungan lipoprotein dan lesitin serta sumber energi yang sama sehingga menghasilkan kualitas semen beku yang sama dan rendah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada

1. Dr. drh. Enny Tantini Setiatin, M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Utama, Daud Samsudewa, S.Pt., M.Si., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota atas segala bimbingan dan arahan selama penyusunan jurnal.
2. Dr. Ir. Yon Soepri Ondho, M.S, Dr. Ir. Sutopo, M.Sc., Dr. Ir. M. I. Sri Wuwuh, M.S. dan Alam Suryawijaya selaku pembimbing lapangan yang telah membimbing selama melakukan penelitian.
3. Rita Purwasih, Lucy Nurika Varasofiari dan Arry Diwityastuhu sebagai Tim Penelitian Sapi jawa Brebes.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini, I., T. Wresdiyati, dan E.F. Retnani. 2006. Pengujian morfologi spermatozoa sapi Bali (*Bos sondaicus*) menggunakan pewarnaan "williams". J. Indonesian Tropical Animal Agriculture **31**(2):105-110.
- Arifiantini, R.I., dan T.L. Yusuf. 2004. Keberhasilan penggunaan tiga pengencer dalam dua jenis kemasan pada proses pembekuan semen sapi Friesian Holstein. Fakultas Kedokteran hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Arifiantini, I., T.L. Yusuf, dan D. Yanti. 2005. Kaji banding kualitas semen beku sapi Friesian Holstein menggunakan pengencer dari berbagai Balai Inseminasi Buatan di Indonesia. Animal Production **7**(3):168-176.
- BIB Ungaran (Petunjuk Teknis). 2011. Standar Operasional Pelayanan (SOP). BIB Sidomulyo Ungaran, Semarang.
- Bearden, H.J., and J.W. Fuquay, 2000. Applied Animal Reproduction. 5th Ed. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey. pp.29.
- Campbell, J. R., K. L. Campbell, and M. D. Kenealy. 2003. Artificial Insemination. In: Anim. Sci. 4th Ed. Mc Graw-Hill. New York.
- Dahmani, Y. 2011. Semen Evaluation Methods in Cattle. Magapor R&D Department. http://www.magapor.com/images/Veterinarios/iDoc_18.pdf. Diakses pada tanggal 10 Desember 2012.
- Deka B.C. and Rao A.R. 1986. Motility of buck spermatozoa during preservation at 5⁰C with and without sminal plasma. Indian Vet. J **63**:169-170.

- Djanuar, R. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Garner, D. L. and E. S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In: E.S.E. Hafez and B. Hafez (Eds). *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. 2000. Semen Evaluation, In: Hafez, B., and E.S.E. Hafez (Eds). *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Hafez, B. and Hafez. E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7thed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Parish's, J. 2003. Web site University of Wisconsin Department of Animal Sciences Reproductive Physiology class. http://www.wisc.edu/ansci_repro/. Diakses pada tanggal 6 Februari 2013.
- Saili, T., Hamzah, dan A. S. Aku. 2008. Kualitas spermatozoa Epididimis Sapi Peranakan Ongole (PO) yang disimpan pada suhu 3-5⁰C. Fakultas Pertanian. Universitas Haluoleo, Kendari. (Skripsi)
- Setyaningsih, N. I. 2012. Pengaruh penambahan vitamin C dalam pengencer tris kuning telur terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa domba Merino *post thawing*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- 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*). Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. (Tesis)
- Solihati, N., R. Idi, S.D. Rasad, M. Rizal dan M. Fitriati. 2008. Kualitas spermatozoa *cauda epididymis* sapi peranakan ongol (PO) dalam pengencer susu, tris dan sitrat kuning telur pada penyimpanan 4-5⁰ C. J. Anim. Prod. **10** (1) : 22-29.
- Steinbach, J. and R. H. Foote. 1967. Osmotic Pressure and pH Effects on survival of frozen on liquid spermatozoa. *Journal of Dairy Science* **50**:205-213.
- Suprayogi, T. W. 1996. Pengaruh Waktu Penyimpanan Bahan Pengencer Kuning Telur Sitrat Terhadap Daya Fertilisasi Sel Mani Domba. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Toelihere, M. R., 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak Cetakan II. Angkasa, Bandung.
- Toelihere, M. R., 1993. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Walson, P.F. and Martin, C.A. 1975. The Influences of same fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5⁰C. *Reprod Fertil Dev* **69**:856-857.
- Witarsa. 2001. Evaluasi Semen. BIB Lembang. Bandung.
- Zenichiro, K., Herliantien, dan Sarastina. 2002. Teknologi Prosesing Semen Beku pada Sapi. Balai Inseminasi Buatan Singosari, Malang.