

Terakreditasi

Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan, Kemenristekdikti
Keputusan No: 21/E/KPT/2018, Tanggal 9 Juli 2018

DOI: <http://dx.doi.org/10.33772/jitro.v6i2.6023>
<http://ojs.uho.ac.id/index.php/peternakan-tropis>

Daya Hidup Spermatozoa Sapi Limousin yang Dipreservasi dengan Pengencer Tris dan Berbagai Konsentrasi Sari Kedelai

Jacky Setiofan Coester, Abrani Sulaiman, Muhammad Rizal*

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Lambung Mangkurat
Jl. Jenderal Ahmad Yani Km. 36 Banjarbaru, Kalimantan Selatan 70714

*Email korespondensi: mrizal@ulm.ac.id

(diterima: 28-03-2019; disetujui 15-04-2019)

ABSTRAK

digunakan sebagai salah satu bahan pengencer semen pengganti kuning telur ayam. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh sari kedelai dalam pengencer Tris terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi limousin yang dipreservasi pada suhu 5°C. Semen ditampung dengan vagina buatan. Semen segar yang memenuhisyarat dibagi kedalam empat buah tabung reaksi yang masing-masing berisi pengencer perlakuan, yakni: 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur (Tris), 97% pengencer dasar Tris + 3% sari kedelai (SK3), 95% pengencer dasar Tris + 5% sari kedelai (SK5), dan 93% pengencer dasar Tris + 7% sari kedelai (SK7). Semen yang telah diencerkan disimpan di dalam refrigerator pada suhu 5°C, dan dievaluasi motilitas dan viabilitas spermatozoa setiap hari hingga hari kelima. Hasil penelitian menunjukkan bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa di dalam pengencer Tris nyata ($P < 0,05$) lebih tinggi dibandingkan dengan spermatozoa di dalam pengencer SK3, SK5, dan SK7 selama empat hari penyimpanan. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pengencer Tris-kuning telur lebih baik dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi limousin dibandingkan dengan pengencer Tris-sari kedelai yang dipreservasi pada suhu 5°C. Pengencer Tris dengan konsentrasi 3% sari kedelai lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 5% dan 7%.

Kata Kunci : sapi limousine, sari kedelai, semen, tris

ABSTRACT

Soybean contains anlecithin (phosphatidyl choline), that has the potential to be used as substitute for chicken egg yolk as one of the semen extender compound. The aim of this research was to examine the effect of soybean juice in Tris extender on the motility and viability of Limousin cattle spermatozoa preserved at 5°C. Semen was collected using artificial vagina. Fresh semen was divided into four tubes containing a treatment extender, i.e. 80% Tris base extender + 20 egg yolk (Tris), 97% Tris-based extender + 3% soybean juice (SJ3), 95% Tris-based extender + 5% soybean juice (SJ5), 93% Tris-based extender + 7% soybean juice (SJ7), respectively. Diluted-semen was preserved in refrigerator at 5°C, and evaluation of spermatozoa motility and viability were conducted on daily basis up to five days. The result showed that percentages of motility and viability of spermatozoa in Tris-yolk extender were significantly ($P < 0.05$) higher than spermatozoa in SJ3, SJ5, and SJ7 extenders during four days of storage. In conclusion, Tris-yolk extender is better than Tris-soybean juice in maintaining the spermatozoa motility and viability of Limousin cattle preserved at 5°C. Tris extender containing 3% soybean juice is better than 5% and 7%.

Keywords: limousin cattle, semen, soybean juice, tris

PENDAHULUAN

Salah satu usaha untuk meningkatkan kualitas genetik dan produktivitas sapi lokal adalah melalui penerapan bioteknologi reproduksi inseminasi buatan (IB) menggunakan sapi yang mempunyai kualitas genetik unggul, diantaranya sapi limousin. Berhasilnya program IB pada ternak tidak hanya ditentukan oleh kualitas semen yang diejakulasikan pejantan, tetapi juga bergantung pada kesanggupan untuk mempertahankan kualitas dan memperbanyak volume semen tersebut untuk beberapa saat lebih lama setelah ejakulasi sehingga lebih banyak betina akseptor yang akan diinseminasi (Susilawati *et al.*, 1999).

Usaha untuk mempertahankan kualitas semen dan memperbanyak volume sebuah ejakulasi pejantan unggul adalah melakukan pengenceran semen dengan beberapa jenis bahan pengencer. Bahan yang digunakan sebagai pengencer semen harus memenuhi beberapa persyaratan seperti: memiliki sumber energi, penyangga, tidak toksik, mencegah kerusakan pada spermatozoa saat preservasi, dan tidak menurunkan daya fertilitas spermatozoa (Futino *et al.* 2010).

Salah satu bahan pengencer yang umum digunakan untuk pengenceran semen ternak adalah kuning telur ayam. Fosfatidil kolin (lesitin) dan kolesterol yang terkandung di dalam kuning telur ayam menjadi alasan utama pemanfaatan kuning telur tersebut sebagai salah satu bahan pengencer semen. Menurut Park & Graham (1992) lesitin berfungsi melindungi spermatozoa dari kerusakan akibat preservasi semen pada suhu dingin, seperti 5°C pada preservasi semen cair dan -196°C pada kriopreservasi. Namun, kuning telur memiliki risiko karena kontaminasi mikroorganisme (Amirat *et al.*, 2004). Froning (1998) melaporkan bahwa kuning telur ayam ras mengandung *Salmonella typhimurium* sebanyak rata-rata 67,09 CFU/ml.

Kacang kedelai juga mengandung lesitin yang dapat melindungi spermatozoa dari pengaruh buruk kejutan dingin (*cold shock*), dan tidak rentan terkontaminasi mikroorganisme (Thun *et al.*, 2002; Ogbuewu *et al.*, 2010), sehingga sari kedelai berpotensi sebagai pengganti kuning telur ayam dalam proses preservasi dan kriopreservasi semen. Penelitian ini bertujuan untuk menguji pengaruh sari kedelai dalam pengencer Tris

terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi Limousin yang dipreservasi pada suhu 5°C.

MATERI DAN METODE

Koleksi dan Preservasi Semen

Semen sapi limousin ditampung dengan vagina buatan di Balai Inseminasi Buatan (BIB) Provinsi Kalimantan Selatan, Banjarbaru. Semen segar dievaluasi kualitasnya meliputi: volume semen serta konsentrasi, motilitas, hidup, dan abnormalitas spermatozoa. Preservasi dan evaluasi spermatozoa selama penyimpanan dilakukan di Laboratorium Produksi Ternak, Program Studi Peternakan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru.

Semen segar dibagi ke dalam empat buah tabung reaksi yang masing-masing berisi pengencer perlakuan, yakni: 80% pengencer dasar Tris + 20% kuning telur ayam ras (Tris), 97% pengencer dasar Tris + 3% sari kedelai (SK3), 95% pengencer dasar Tris + 5% sari kedelai (SK5), dan 93% pengencer dasar Tris + 7% sari kedelai (SK7). Seluruh tabung reaksi dimasukkan ke dalam gelas piala berisi air bersih dan disimpan di dalam refrigerator pada suhu 5°C. Kualitas spermatozoa meliputi spermatozoa motil dan hidup masing-masing perlakuan dievaluasi setiap hari hingga spermatozoa motil mencapai minimum 40% (SNI 4869.1:2017).

Variabel yang Dievaluasi

Variabel kualitas spermatozoa yang dievaluasi selama preservasi adalah persentase spermatozoa motil dan persentase spermatozoa hidup. Persentase motilitas spermatozoa dievaluasi secara subyektif berdasarkan petunjuk Rasul *et al.* (2001). Evaluasi spermatozoa hidup dilakukan dengan metode pewarnaan diferensial menggunakan pewarna eosin-nigrosin (Felipe-Perez *et al.*, 2008).

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan empat perlakuan dan enam kali ulangan. Data yang dikumpulkan dianalisis menggunakan analisis ragam dan perbedaan antarperlakuan diuji dengan uji bedanya terkecil (BNT). Alat analisis ini tersedia di dalam program SAS statistical software (SAS 9.1, 2001).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar Sapi Limousin

Hasil pengamatan didapatkan nilai rata-rata karakteristik semen segar sapi limousin yakni: volume semen sebanyak 5,75 ml, konsentrasi spermatozoa 1.464 juta/ml, persentase spermatozoa motil 75%, dan persentase spermatozoa hidup 84% (Tabel 1). Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa semen segar sapi limousin tersebut memenuhi syarat untuk diproses menjadi semen cair atau semen beku.

Tabel 1. Karakteristik semen segar sapi limousin

Unsur	Rataan \pm SD
Volume (ml)	5,75 \pm 0,65
Konsentrasi spermatozoa (juta/ml)	1.464,00 \pm 240,19
Spermatozoa motil (%)	75,00 \pm 0,00
Spermatozoa hidup (%)	84,00 \pm 0,89
Spermatozoa abnormal (%)	5,38 \pm 0,55

Pada penelitian ini volume semen sapi limousin berada pada kisaran yang normal. Volume semen hasil penelitian ini lebih rendah dibandingkan volume semen sapi limousin hasil penelitian Rahmawati *et al.* (2015) sebanyak rata-rata 6,73 ml dan Wiratri *et al.* (2014) sebanyak rata-rata 6,75 ml. Namun demikian, ada beberapa hasil penelitian yang melaporkan volume semen lebih rendah daripada hasil penelitian ini antara lain 3,2-7,3 ml (Sumeidiana *et al.*, 2007; Hartanti *et al.*, 2012) dan 4-8 ml (Arifiantini, 2012).

Konsentrasi spermatozoa sapi limousin yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan hasil yang cukup baik yaitu sebesar 1.464 juta/ml. Wiratri *et al.* (2014) melaporkan konsentrasi spermatozoa limousin rata-rata 1.144,25 juta/ml. Konsentrasi spermatozoa sapi sebanyak 1.000-1.800 juta/ml (Sumeidiana *et al.*, 2007; Susilawati, 2013) dan 800-2.000 juta/ml (Garner & Hafez, 2000).

Persentase spermatozoa motil semen segar sapi limousin pada penelitian ini rata-rata 75%. Hasil yang diperoleh sama dengan yang dilaporkan oleh Komariah *et al.* (2013) bahwa persentase spermatozoa motil sapi limousin rata-rata 75,3%. Persentase spermatozoa motil pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Muada *et al.* (2017) yang mendapatkan persentase spermatozoa motil semen segar sapi limousin rata-rata 59,29%.

Persentase spermatozoa hidup semen segar sapi limousin pada penelitian ini rata-rata 84%. Hasil pada penelitian ini tidak berbeda dengan yang dilaporkan oleh Arifiantini *et al.* (2005) bahwa persentase spermatozoa hidup semen segar sapi adalah 83,38-88,94%. Wiratri *et al.* (2014) melaporkan persentase spermatozoa hidup sapi limousin yang lebih rendah, yakni rata-rata 78,3%.

Persentase spermatozoa abnormal sapi limousin pada penelitian ini yaitu sebesar rata-rata 5%. Persentase spermatozoa abnormal sapi limousin rata-rata 10,4% (Nugroho *et al.*, 2014) dan 8,54% (Wiratri *et al.*, 2014).

Kualitas Spermatozoa selama Preservasi

Berdasarkan hasil penelitian selama empat hari preservasi, persentase spermatozoa motil dan hidup secara keseluruhan mengalami penurunan mulai dari hari kedua hingga kelima (Tabel 2 dan Tabel 3). Persentase spermatozoa motil dan hidup perlakuan Tris (kontrol) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan SK3, SK5, dan SK7. Hal ini diduga karena kandungan lesitin yang terdapat di dalam kuning telur ayam lebih banyak dibandingkan dengan yang terkandung di dalam sari kedelai. Dong *et al.* (2006) melaporkan bahwa kandungan lesitin di dalam kuning telur ayam sebanyak 77%, sementara di dalam kedelai sebanyak 18% (Wu & Wang, 2003) atau sebanyak 17,5-23% (Aku *et al.*, 2007). Kandungan lesitin yang lebih banyak pada kuning telur ayam, menyebabkan kemampuannya dalam melindungi spermatozoa dari kerusakan selama preservasi pada suhu dingin lebih baik dibandingkan dengan sari kedelai, sehingga berpengaruh positif terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Forouzanfar *et al.* (2010) bahwa bahan pengencer yang mengandung 1% kedelai lebih baik dalam mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa domba dibandingkan dengan bahan pengencer yang mengandung 20% kuning telur ayam.

Fosfolipid berupa lesitin (fosfatidil kolin) yang terkandung di dalam kuning telur ayam atau sari kedelai berperan penting dalam melindungi membrane plasma sel spermatozoa selama proses penyimpanan pada suhu rendah. Senyawa lesitin tersebut bersifat membran *coating* untuk mempertahankan konfigurasi normal fosfolipid bilayer yang merupakan susunan utama membran plasma sel spermatozoa. Rizal & Herdis (2008)

Tabel 2. Rataan spermatozoa motil sapi limousin selama preservasi

Perlakuan	Presevasi hari ke-				
	1	2	3	4	5
Tris	75,00 ± 0,00	64,00 ± 1,79 ^a	52,67 ± 0,82 ^a	44,00 ± 1,67 ^a	33,00 ± 2,37 ^a
SK3	75,00 ± 0,00	62,00 ± 1,67 ^b	51,00 ± 0,98 ^b	42,00 ± 1,41 ^b	30,00 ± 2,28 ^b
SK5	75,00 ± 0,00	60,00 ± 1,26 ^c	49,00 ± 1,79 ^c	40,00 ± 1,79 ^c	28,67 ± 1,86 ^b
SK7	75,00 ± 0,00	58,00 ± 1,67 ^d	47,17 ± 1,72 ^d	39,00 ± 1,41 ^c	25,00 ± 1,41 ^c

^{abcd}Superskrip dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Tris: 80% pengencer dasar tris + 20% kuning telur ayam ras

SK3: 97% pengencer dasar tris + 3% sari kedelai

SK5: 95% pengencer dasar tris + 5% sari kedelai

SK7: 93% pengencer dasar tris + 7% sari kedelai.

Tabel 3. Rataan spermatozoa hidup sapi limousin selama preservasi

Perlakuan	Presevasi hari ke-				
	1	2	3	4	5
Tris	84,00 ± 0,89	79,50 ± 1,05 ^a	72,67 ± 1,75 ^a	60,00 ± 1,55 ^a	44,67 ± 1,75 ^a
SK3	84,00 ± 0,89	78,83 ± 1,17 ^a	70,50 ± 2,17 ^{ab}	57,67 ± 2,16 ^a	41,67 ± 2,16 ^b
SK5	84,00 ± 0,89	78,67 ± 1,75 ^a	68,50 ± 2,43 ^{bc}	54,33 ± 2,50 ^b	38,00 ± 1,41 ^c
SK7	84,00 ± 0,89	76,33 ± 1,63 ^b	67,50 ± 2,07 ^c	47,83 ± 1,47 ^c	35,83 ± 1,17 ^c

^{abcd}Superskrip dalam kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Tris: 80% pengencer dasar tris + 20% kuning telur ayam ras

SK3: 97% pengencer dasar tris + 3% sari kedelai

SK5: 95% pengencer dasar tris + 5% sari kedelai

SK7: 93% pengencer dasar tris + 7% sari kedelai.

menyatakan bahwa lesitin merupakan asam lemak yang dominan menyusun membran plasma sel spermatozoa. Semakin tinggi kandungan lesitin di dalam pengencer semen, semakin besar kemungkinan mencegah terjadinya kerusakan spermatozoa akibat pengaruh buruk kejutan dingin (*cold shock*) selama preservasi, yang dapat menyebabkan kematian spermatozoa. Hal ini sesuai dengan pendapat Sugiarto *et al.* (2014) bahwa persentase hidup spermatozoa bergantung pada keutuhan membran plasma sel spermatozoa. Kerusakan membran plasma sel spermatozoa akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme intraseluler, sehingga berakibat pada kematian spermatozoa.

Hasil penelitian diperoleh bahwa semakin tinggi konsentrasi penambahan sari kedelai semakin rendah angka motilitas dan daya hidup spermatozoa selama empat hari preservasi. Hal ini diduga karena penambahan sari kedelai dalam jumlah yang banyak akan menyebabkan meningkatnya tekanan osmotik pengencer, yang mungkin kurang mampu diadaptasi dengan baik oleh spermatozoa sehingga berdampak negatif terhadap kualitas spermatozoa. Hasil beberapa

penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kedelai yang optimal untuk kriopreservasi semen kambing adalah 1,5% (Salmani *et al.*, 2014), 1,25% untuk kriopreservasi semen kuda (Nouri *et al.*, 2013), 1% untuk kriopreservasi semen kucing (Vick *et al.*, 2010), 0,8% untuk preservasi semen anjing (Kmenta *et al.*, 2011), serta 2,5% dan 3,75% untuk preservasi semen kambing peranakan etawa (Putra, 2012).

Pada hari keempat preservasi, perlakuan Tris menunjukkan persentase spermatozoa motil paling tinggi sebanyak rata-rata 44%, nyata (P<0,05) lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan SK3(42%), SK5(40%), dan SK7(39%). Berdasarkan data persentase spermatozoa motil tersebut diperoleh bahwa perlakuan Tris, SK3, dan SK5 masih mampu mempertahankan motilitas spermatozoa sapi limousin $\geq 40\%$ hingga hari keempat preservasi (selama tiga hari), sedangkan perlakuan SK7 hanya mampu bertahan hingga hari ketiga preservasi (selama dua hari). Berdasarkan SNI 4869.1-2008 ditetapkan bahwa semen yang memenuhi syarat digunakan dalam program IB harus memiliki motilitas minimum 40% (Standar Nasional Indonesia, 2008).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pengencer Tris kuning telur lebih baik dalam mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa sapi limousin dibandingkan dengan pengencer Tris sari kedelai yang dipreservasi pada suhu 5°C. Pengencer Tris dengan konsentrasi 3% sari kedelai lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 5% dan 7%.

DAFTAR PUSTAKA

- Aku, A.S., N. Sandiah, P.D. Sadsoeitoeboen, M. Rizal, & Herdis. 2007. Manfaat lesitin nabati pada preservasi dan kriopreservasi semen: suatu kajian pustaka. *Animal Production* 9:49-52.
- Amirat, L., D. Tainturier, L. Jeanneau, C. Thorin, O. Gerard, & J.L. Courtens. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61:895-907.
- Arifiantini, R.I., T.L. Yusuf, & D. Yanti. 2005. Kaji banding kualitas semen beku sapi Friesian Holstein menggunakan pengencer dari berbagai Balai Inseminasi Buatan di Indonesia. *Animal Production* 7:168-176.
- Arifiantini, R.I. 2012. Teknik Koleksi dan Evaluasi Semen pada Hewan. IPB Press, Bogor.
- Dong, U.A., H.L. Sang, S. Haribabu, J.L. Eun, & C.K. Jae. 2006. Sequential separation of main component from chicken egg yolk. *Food Science Biotechnology* 12:189-195.
- Felipe-Perez, Y.E., M.L. Juarez-Mosqueda, E.O. Hernandez-Gonzalez, & J.J. Valencia. 2008. Viability of fresh and frozen bull sperm compared by two staining techniques. *Acta Veterinaria Brasilia* 2:123-130.
- Forouzanfar, M., M. Sharafi, S.M. Hosseini, S. Ostadhosseini, M.Hajian, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, H.R. Rahmani, & M.H.Nasr-Esfahani. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 73:480-487.
- Froning, G.W. 1998. Recent advances in egg products research and development. Presented at the University of California Egg Processing Workshop. Riverside and Modesto, June 2-3, 1998.
- Futino, D., M. Mendes, W. Matos, R. Mondadori, & C. Lucci. 2010. Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide canine semen cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals* 45:214-220.
- Garner, D.L. & E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and plasma semen. In: *Reproduction in Farm Animals*. E.S.E. Hafez and B. Hafez (eds). 7th Ed. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA. Pp. 82-95.
- Hartanti, D., E.T. Setiatin, & Sutopo. 2012. Perbandingan penggunaan pengencer semen sitrat kuning telur terhadap persentase daya hidup spermatozoa sapi Jawa Brebes. *Animal Agriculture Journal* 1:33-42.
- Kmenta, I., C. Strohmayer, F.M. Schlosser, & S.S. Somi. 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology* 75:1095-1103.
- Komariah, R.I. Arifiantini & F.W. Nugraha. 2013. Kaji banding kualitas spermatozoa sapi simmental, limousin, dan friesian holstein terhadap proses pembekuan. *Buletin Peternakan* 37:143-147.
- Mauda, D.B., U. Papatungan, M.N. Hendrik, & S.H. Tarungan. 2017. Karakteristik semen segar sapi bangsa limousin dan simental di Balai Inseminasi Buatan Lembang. *Jurnal Zootek* 37:360-369.
- Nouri, H., A. Towhidi, M. Zhandi, & R. Sadeghi. 2013. The effects of centrifuged egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze miniature Caspian horse semen. *Journal of Equine Veterinary Science* 33:1050-1053.
- Nugroho, Y., T. Susilawati, & S. Wahjuningsih. 2014. Kualitas semen sapi limousin selama pendinginan menggunakan pengencer CEP-2 dengan penambahan berbagai konsentrasi

- kuning telur dan sari buah jambu biji (*Psidium guajava*). Jurnal Ternak Tropika 15:31-42.
- Ogbuewu, I.P., N.O. Aladi, I.F. Etuk, M.N. Opara, M.C. Uchegbu, I.C. Okoli, & M.U. Iloeje. 2010. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. Research Journal of Veterinary Science 3:138-164.
- Park, J.E. & J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 30:209-22.
- Putra, A. 2012. Pemanfaatan Tris Sari Kedelai Sebagai Bahan Pengencer Semen Cair Kambing Peranakan Etawah. Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Rahmawati, M.A., T. Susilawati, & M.N. Ihsan. 2015. Kualitas semen dan produksi semen beku pada sapi dan bulan penampungan yang berbeda. Jurnal Ilmu-ilmu Peternakan 25:25-36.
- Rasul, Z., N. Ahmad, & M. Anzar. 2001. Changes in motion characteristics, plasma membrane integrity and acrosome morphology during cryopreservation of buffalo spermatozoa. Journal of Andrology 22:278-283.
- Rizal, M. & Herdis. 2008. Inseminasi Buatan pada Domba. Rineka Cipta, Jakarta.
- Salmani, H., A. Towhidi, M. Zhandi, M. Bahreini & M. Sharaf. 2014. In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. Cryobiology 68:276-280.
- SAS Institute. 2001. SAS state software: Changes and enhancement through release 9.1. SAS institute Inc., Cary, NC.
- Standar Nasional Indonesia. 2008. Semen Beku Sapi (SNI 4869.1-2008). Badan Standardisasi Nasional, Jakarta.
- Sugiarto, N., T. Susilawati, & S. Wahjuningsih. 2014. Kualitas semen cair sapi limousin selama pendinginan menggunakan pengencer CEP-2 dengan penambahan berbagai konsentrasi sari kedelai. Jurnal Ternak Tropika 15:51-57.
- Sumeidiana, I., S. Wuwuh & E. Mawarti. 2007. Volume dan konsentrasi spermatozoa sapi simental, limousin, dan brahman di Balai Inseminasi Buatan Ungaran. Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture 32:131-137.
- Susilawati, T., S.B. Sumitro, S. Hardjopranjoto, M.S. Djati & G. Ciptadi. 1999. Kaji banding antara pengencer Tris dengan TCM-199 dalam upaya pembekuan semen sapi hasil penyaringan sephadex G-200. Media Veteriner 6:9-13.
- Susilawati, T. 2013. Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak. Universitas Brawijaya Press. Malang.
- Thun, R., M. Hurtado, & F. Jane. 2002. Comparison of Biochips-Plus® and tris egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. Theriogenology 57:1087-1094.
- Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.
- Wiratri, V.D.B., T. Susilawati & S. Wahjuningsih. 2014. Kualitas semen sapi limousin pada pengencer yang berbeda selama pendinginan. Jurnal Ternak Tropika 15:13-20.
- Wu, Y. & T. Wang. 2003. Soybean lecithin fractionation and functionality. Journal of the American Oil Chemists' Society 80:319-326.