

PENGARUH PENAMBAHAN BERBAGAI SUMBER KARBOHIDRAT PADA PENGECER SKIM KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SEMEN BEKU SAPI BALI

The Effect of Various Sources Carbohydrate Supplementation in Skim Egg Yolk Extender towards the Frozen Semen Quality of Bali Bull

Ajrul Mukminat^a, Sri Suharyati^b, Siswanto^b

^aThe Student of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

^b The Lecture of Department of Animal Husbandry Faculty of Agriculture Lampung University

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture Lampung University

Soemantri Brojonegoro No.1 Gedung Meneng Bandar Lampung 35145

Telp (0721) 701583. e-mail: kajur-jptfp@unila.ac.id. Fax (0721)770347

ABSTRACT

The aim of this research was to know kind of carbohydrate as energy sources in skim egg yolk extender. This study was conducted on April 11th --18th 2014 at Regional Technical Service Unit-Regional Artificial Insemination Office Lampung, Terbanggi Besar District, Central Lampung Regency, Lampung Province. The Completely Randomized Design (CRD) was used in these research with three treatments and three repetitions. The treatment consist of P1 (glucose supplementation 2%), P2 (fructose supplementation 2%) and P3 (sucrose supplementation 2%). The data obtained was analyzed by using variance analysis 5%.

Results of this research showed that there was no significantly ($P>0.05$) between provision of glucose, fructose although sucrose that added in each skim egg yolk extender towards the motility of sperm cells and life percentage.

Key word : Carbohydrate, skim egg yolk, quality of frozen semen, Bali Bull

PENDAHULUAN

Sapi Bali merupakan sapi dari golongan *Bos sondaicus* yang mengalami proses domestikasi di wilayah Pulau Jawa atau Bali dan Lombok. Secara umum ukuran badan Sapi Bali termasuk kategori sedang dengan berat dewasa berkisar antara 211--303 kg untuk ternak betina dan 337--494 kg untuk ternak jantan. Sapi Bali memiliki daya adaptasi tinggi terhadap lingkungan dan dapat menggunakan sumber pakan yang terbatas, sehingga cocok untuk dikembangkan sebagai ternak potong asli Indonesia (Guntoro, 2008).

Keberhasilan teknik IB ditandai dengan buntingnya sapi betina sehingga dapat meningkatkan populasi sapi di Indonesia. Salah satu faktor penting yang harus diperhatikan dalam teknik IB adalah faktor pejantan, pejantan yang diseleksi berdasarkan genetik dengan mutu tinggi yang disertai dengan manajemen pemeliharaan yang baik, akan menghasilkan semen yang berkualitas.

Kualitas semen beku dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya adalah suhu dan cahaya pada saat perlakuan dan penyimpanan semen untuk inseminasi buatan, serta kadar pengenceran dan bahan pengencer yang

digunakan (Toelihere, 1985). Pengencer yang baik akan mampu mempertahankan fertilitas spermatozoa dan mampu menyediakan nutrisi sebagai sumber energi yang cukup untuk mempertahankan hidup sperma dari proses pembekuan sampai sperma tersebut siap digunakan untuk keperluan IB.

Ketersediaan sumber energi yang berasal dari karbohidrat merupakan salah satu prasyarat untuk pengencer semen yang baik. Karbohidrat memiliki beberapa fungsi, yaitu sumber energi bagi sperma selama inkubasi, memelihara tekanan osmotik cairan dan dapat bertindak sebagai krioprotektan. Karbohidrat merupakan jenis sumber energi terbaik bagi sperma. Terdapat tiga jenis karbohidrat yang mudah didapat dan sering digunakan sebagai sumber energi bagi sperma dalam berbagai jenis penelitian, yaitu glukosa, fruktosa dan sukrosa. Penambahan karbohidrat ke dalam pengencer akan sangat berguna dan membantu bagi daya hidup spermatozoa (Salisbury dan VanDemark, 1985).

Berdasarkan Instruksi Kerja BIB Ungaran (2011), penggunaan 2% glukosa dalam pengencer skim kuning telur nyata mempertahankan motilitas spermatozoa. Namun, Panglowhapan (2003) menyatakan

bahwa fruktosa mempertahankan motilitas sperma paling tinggi dibanding glukosa dan campurannya. Berdasarkan penelitian Raharjo (2002), penambahan 2% fruktosa ke dalam pengencer skim kuning telur memberikan hasil yang lebih baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa. Menurut Woelders dkk., (1997), penambahan gula berupa sukrosa atau trehalosa di dalam pengencer nyata meningkatkan motilitas sperma semen beku sapi. Menurut Rizal (2006), penambahan 0,2% sukrosa sebagai krioprotektan ekstraseluler ke dalam pengencer dapat meningkatkan kualitas spermatozoa domba garut.

Penggunaan jenis karbohidrat yang tepat sebagai sumber energi dan krioprotektan bagi sperma dalam pengencer skim kuning telur akan berdampak pada kualitas semen beku yang dihasilkan terutama terhadap motilitas sperma dan persentase sperma hidup. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terhadap jenis karbohidrat terbaik yang dapat digunakan sebagai sumber energi bagi sperma Sapi Bali dalam pengencer skim kuning telur.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 11--18 April 2014 di Laboratorium Unit Pelayanan Teknis Daerah Balai Inseminasi Buatan Daerah Lampung, Kecamatan Terbanggi Besar, Kabupaten Lampung Tengah, Provinsi Lampung.

Semen yang digunakan berasal dari Sapi Bali berumur 5 tahun dengan satu kali ejakulasi. Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan tiga ulangan, yaitu P1 (penambahan glukosa 2%), P2 (penambahan fruktosa 2%) dan P3 (penambahan sukrosa 2%). Data yang diperoleh dianalisis ragam pada taraf nyata 5% (Steel dan Torrie 1993).

Prosedur penelitian ini dimulai dengan penampungan semen menggunakan vagina buatan dan segera diperiksa secara makroskopis (volume, warna, konsistensi semen segar dan pH semen) dan mikroskopis (motilitas massa, motilitas individu dan konsentrasi sperma). Semen segar yang memenuhi syarat akan diproses lebih lanjut ke proses pengenceran. Ada 4 tahapan proses pembuatan pengencer semen skim kuning telur, yaitu pembuatan buffer skim, pembuatan buffer antibiotik, pembuatan pengencer part A yang terdiri atas 90% buffer skim antibiotik dan kuning telur dengan persentase kuning telur sebanyak 10% dari total pengencer part

A, dan pembuatan pengencer part B yang terdiri atas 72% buffer skim antibiotik, 10% kuning telur, 16% gliserol, dan ditambahkan dengan masing-masing perlakuan, yaitu penambahan glukosa 2%, penambahan fruktosa 2%, dan penambahan sukrosa 2%.

Setelah diencerkan semen akan mengalami proses ekuilibrasi dan setelah ekuilibrasi akan dilakukan pemeriksaan terhadap motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup. Semen akan dikemas melalui proses filling dan sealing. Pembekuan semen diawali dengan proses preefreezing, kemudian dilakukan pemeriksaan setelah preefreezing. Dilanjutkan dengan proses freezing, setelah proses ini semen akan disimpan selama 24 jam kemudian diperiksa motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup setelah proses thawing.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penilaian Kualitas Semen Segar Sapi Bali

Semen segar diperoleh dari pejantan Sapi Bali berumur 5 tahun. Hasil pemeriksaan memperlihatkan bahwa semen semen segar Sapi Bali yang diperoleh cukup baik sehingga dapat diproses lebih lanjut (Tabel 1)

Tabel 1. Kualitas semen segar Sapi Bali

Parameter	Nilai
Volume (ml)	7
Warna	Krem
Bau	Khas
Konsistensi	Sedang
pH	6--7
Motilitas Massa	+++
Motilitas Individu (%)	75
Konsentrasi (juta/ml)	1.239
Spermatozoa Hidup (%)	79,60

Keterangan :

+++ : sangat baik; terlihat seperti gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif bertenaga;

Hasil pemeriksaan ini menunjukkan volume semen yang tertampung sebesar 7 ml. Hasil ini sesuai dengan kisaran normal volume semen sapi antara 5--8 ml/ejakulasi (Garner dan Hafez, 2000); 2--10 ml/ejakulasi (Nalbandov, 1990); 1--15 ml/ejakulasi (Toelihere, 1993). Warna semen yang ditampung adalah krem, sesuai dengan pernyataan Feradis (2010) dan Nursyam

(2007) bahwa semen sapi normal berwarna putih susu atau krem keputihan dan keruh. Semen berbau khas sapi pejantan, hal ini sesuai dengan pendapat Toelihere (1993) bahwa sapi pejantan menghasilkan semen yang berbau khas. Konsistensi atau derajat kekentalan semen sedang dengan konsentrasi spermatozoa 1.239 juta/ml, penilaian ini sesuai dengan penilaian konsentrasi semen segar, bila konsentrasi spermatozoa 1.000--1.500 juta dikatakan sedang dan konsentrasi spermatozoa sapi yang baik berkisar 800--2000x10⁶ (Toelihere, 1993). Derajat keasaman atau pH semen adalah 6--7, sesuai dengan berbagai pendapat yang menyatakan bahwa pH semen segar berkisar antara 6,4--7,8 (Butar, 2009; Nalbandov, 1990; Toelihere, 1985).

Motilitas massa spermatozoa dari semen Sapi Bali yang ditampung adalah +++, hal ini berarti spermatozoa yang ditampung sangat baik, terlihat seperti gelombang besar, banyak, gelap, tebal, dan aktif bertenaga

(Toelihere, 1985). Motilitas individu semen segar adalah 75% bergerak progresif, motilitas individu tersebut masih dalam kisaran normal sesuai dengan pendapat Garner dan Hafez (1993) bahwa motilitas semen berkisar antara 40--75%. Persentase spermatozoa hidup adalah 79,60%, persentase ini cukup baik karena menurut Hafez (2000) persentase hidup semen sapi segar berkisar antara 60%--80%. Berdasarkan pemeriksaan semen segar secara makroskopis dan mikroskopis, semen yang ditampung memiliki kualitas baik dan sesuai standar untuk diproses lebih lanjut menjadi semen beku.

Pengaruh Penambahan Karbohidrat terhadap Motilitas Semen

Motilitas atau daya gerak progresif spermatozoa mempunyai peranan penting dalam proses fertilisasi (Susilawati, 2003).

Tabel 2. Rataan motilitas spermatozoa

Tahap Pengamatan	Perlakuan		
	P1	P2	P3
	-----%-----		
Setelah Equilibrasi	55,00 ± 0,00	56,66 ± 2,88	53,33 ± 2,88
Setelah Prefreezing	41,66 ± 2,88	43,33 ± 2,88	40,00 ± 0,00
Setelah Thawing	40,00 ± 0,00	40,00 ± 0,00	38,33 ± 2,88

Keterangan :

P1 : Penambahan Glukosa 2%

P2 : Penambahan Fruktosa 2%

P3 : Penambahan Sukrosa 2%

Hasil analisis ragam penambahan sumber karbohidrat glukosa 2%, fruktosa 2% dan sukrosa 2% dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap persentase motilitas Sapi Bali tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) di setiap tahap pembekuan. Namun demikian, dari Tabel 2 terlihat bahwa spermatozoa dapat mempertahankan motilitas setelah proses equilibrasi, yaitu 55% penambahan glukosa dan 56,66% pada penambahan fruktosa, hasil ini masih cukup baik dan sesuai dengan pendapat Aminasari (2009) yang menyatakan bahwa motilitas semen yang telah didinginkan pada suhu 5°C tidak boleh berada di bawah 55%.

Penambahan fruktosa cenderung lebih mempertahankan motilitas setelah equilibrasi, hal ini disebabkan karena fruktosa yang ditambahkan ke dalam pengencer yang digunakan merupakan jenis karbohidrat yang sama dengan karbohidrat yang terdapat di

dalam plasma semen. Sesuai dengan pendapat Toelihere (1985) yang menyatakan bahwa bahan pengencer yang digunakan harus mempunyai sifat fisik dan sifat kimiawi yang hampir sama dengan plasma semen. Menurut Hammerstedt (1993), fruktosa juga menghasilkan ATP yang sangat penting untuk kontraksi fibril-fibril pada ekor sperma yang berfungsi untuk menimbulkan pergerakan (motilitas) pada spermatozoa. Demikian pula dengan penambahan glukosa yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa pada kisaran 55%. Glukosa dan fruktosa yang berupa monosakarida ($C_6H_{12}O_6$) akan lebih mudah diolah dalam sel spermatozoa menjadi energi. Sukrosa berupa disakarida ($C_{12}H_{22}O_{11}$) harus diubah menjadi fruktosa atau glukosa terlebih dahulu dan membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menghasilkan energi yang dibutuhkan, sehingga kurang mempertahankan motilitas spermatozoa.

Hasil penelitian pada tahap setelah prefreezing (Tabel 3) menunjukkan motilitas spermatozoa bertahan di atas 40% baik dengan penambahan glukosa (41,66%), penambahan fruktosa (43,33) atau sukrosa (40%). Hasil pemeriksaan setelah thawing menunjukkan motilitas yang masih cukup baik dengan rata-rata sebesar 40%. Hasil ini masih sesuai dengan ketentuan SNI 01.4869.1-2005 yang menyatakan bahwa kualitas semen sapi setelah mengalami proses pembekuan harus menunjukkan spermatozoa hidup dan motil progresif minimal 40% (Dirjenak,2000).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada masing-masing tahap pemeriksaan spermatozoa dapat mempertahankan motilitasnya dalam kisaran normal dan kisaran standar yang ditetapkan untuk semen beku. Penambahan karbohidrat berupa glukosa dan fruktosa pada semen cair adalah mempertahankan motilitas spermatozoa (Panglowhapan, 2003). Gula seperti fruktosa akan menghasilkan ATP yang sangat penting untuk kontraksi fibril-fibril pada ekor sperma yang berfungsi untuk menimbulkan pergerakan (motilitas) pada spermatozoa (Hammerstedt, 1993). Sukrosa berfungsi sebagai substrat sumber energi dan sekaligus sebagai krioprotektan ekstraseluler (Rizal, 2008).

Sebagai substrat sumber energi, glukosa, fruktosa dan sukrosa masuk ke dalam sel dengan dua mekanisme, yaitu transpor aktif dan difusi (Mansjur, 2001). Molekul-molekul karbohidrat ini akan dimetabolisir melalui jalur glikolisis atau dilanjutkan dengan reaksi asam trikarboksilat (siklus Krebs), sehingga dihasilkan energi berupa ATP yang akan dimanfaatkan oleh spermatozoa dalam pergerakan (Rizal, 2008). Dalam proses glikolisis akan dihasilkan 2 mol asam piruvat dan 2 ATP. Asam piruvat yang dihasilkan akan diolah lebih lanjut di dalam siklus Krebs untuk menghasilkan energi, satu mol asam piruvat akan menghasilkan 18 ATP, sehingga 2 mol asam piruvat yang masuk dalam siklus Krebs akan menghasilkan 36 ATP.

Total molekul karbohidrat yang telah dimetabolisme melalui proses glikolisis dan siklus Krebs adalah 38 ATP (Poedjiadi, 1994). Dengan total energi yang dihasilkan sama, maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam pemberian glukosa 2% dan fruktosa 2%. Namun, penambahan sukrosa 2% akan menghasilkan energi dua kali lebih besar dari glukosa dan fruktosa, yaitu 76 ATP karena mengandung unsur C,H dan O yang lebih banyak (Poedjiadi, 1994). Akan tetapi,

pemberian sukrosa juga tidak berpengaruh nyata dalam mempertahankan motilitas spermatozoa, hal ini disebabkan karena sukrosa membutuhkan waktu yang lebih lama dalam menghasilkan energi dan akan menyebabkan penimbunan asam laktat yang lebih banyak sehingga membuat suasana tidak nyaman untuk spermatozoa akibat perombakan energi yang berlebihan.

Sapi Bali dengan kode pejantan 10903 yang digunakan telah berumur 5 tahun, sesuai dengan pendapat Susilawati, dkk (2003) yang menyatakan bahwa pejantan berumur 2 sampai 7 tahun dapat menghasilkan semen terbaik dengan angka kebuntingan yang tinggi pada betina yang dikawini dibandingkan dengan pejantan umur diluar interval tersebut. Pakan yang diberikan mempengaruhi kualitas semen yang diejakulasikan. Pakan yang diberikan kepada pejantan yang digunakan hanya berupa hijauan tanpa tambahan konsentrat. Menurut SOP BIBD Lampung Tengah (2010), kebutuhan protein dari sapi pejantan adalah 14--17%, sedangkan protein yang diberikan hanya 8,7% yang berasal dari rumput gajah.

Pengaruh Penambahan Karbohidrat terhadap Persentase Spermatozoa Hidup

Proses pendinginan 5°C menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH dan kondisi ini dapat bersifat racun terhadap spermatozoa, serta merusak membran plasma yang akhirnya menyebabkan kematian spermatozoa (Susilawati, dkk., 2003).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan karbohidrat berupa glukosa, fruktosa atau sukrosa dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa sampai proses akhir pembekuan lebih dari 40% (Tabel 3) hal ini sesuai dengan pernyataan Samsudewa (2008) bahwa persentase spermatozoa hidup setelah dibekukan tidak boleh kurang dari 40%.

Penambahan glukosa 2% cenderung lebih mempertahankan daya hidup spermatozoa, menurut Maxwell dan Salamon (2000), gula dalam keadaan beku berbentuk seperti kaca (glass) yang tidak tajam, sehingga tidak merusak sel sperma secara mekanik. Menurut Bakas dan Disalvo (1991), gula dapat menjadikan membran plasma sel lebih stabil selama proses kriopreservasi, seperti yang dilaporkan pada berbagai jenis sel lain yang telah dibekukan. Menurut Nicollajsen dan

Hvidt (1994), gula juga memegang peranan penting dalam menurunkan kandungan garam larutan pengencer, sehingga dapat mengurangi efek solusi (solution effect). Ini menyebabkan

gula dapat mencegah perusakan terhadap sel akibat meningkatnya kadar garam selama proses pembekuan.

Tabel 3. Rataan persentase hidup spermatozoa

Tahap Pengamatan	Perlakuan		
	P1	P2	P3
	-----%-----		
Setelah Equilibrasi	61,36 ± 0,77	58,73 ± 0,66	60,58 ± 1,83
Setelah Prefreezing	58,37 ± 0,53	55,59 ± 2,53	58,10 ± 0,42
Setelah Thawing	56,14 ± 0,91	55,58 ± 1,73	55,43 ± 1,17

Keterangan :

P1 : Penambahan Glukosa 2%

P2 : Penambahan Fruktosa 2%

P3 : Penambahan Sukrosa 2%

Penambahan fruktosa juga dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa, sebagai krioprotektan ekstraseluler fruktosa akan melindungi membran plasma sel sperma dari kerusakan secara mekanik yang mungkin terjadi saat proses kriopreservasi semen (Rizal, 2008).

Sukrosa dapat mempertahankan hidup spermatozoa di atas standar yang ditentukan. Efek krioprotektif gula ini dihasilkan dari terbentuknya ikatan hidrogen antara gugus hidroksil gula dan bagian kepala polar fosfolipida membran plasma sel, sehingga gula menggantikan posisi molekul air selama proses dehidrasi berlangsung saat pembekuan (Aisen dkk., 2002). Dengan demikian, karbohidrat yang ditambahkan dapat mengatur fluiditas membran plasma sel sperma. Proses metabolisme yang menghasilkan ATP dapat berlangsung dengan baik jika membran sel tetap terlindungi, sehingga spermatozoa tetap mampu mempertahankan motilitas dan daya hidupnya (Maxwell dan Salamon, 1993).

Energi yang dihasilkan melalui proses glikolisis dan siklus Krebs adalah 38 ATP untuk penambahan glukosa 2% dan fruktosa 2%, serta 76 ATP untuk penambahan sukrosa 2% (Poedjiadi, 1994). Dengan total energi yang dihasilkan sama, maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan dalam pemberian glukosa 2% dan fruktosa 2%. Meskipun penambahan sukrosa 2% menghasilkan energi dua kali lebih besar dari glukosa dan fruktosa, pemberian sukrosa juga tidak berpengaruh nyata dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa, hal ini disebabkan karena dalam menghasilkan energi sukrosa akan menghasilkan asam laktat yang lebih banyak

sehingga membuat suasana tidak nyaman untuk spermatozoa bahkan bersifat toksik dan menyebabkan kematian spermatozoa.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) antara pemberian glukosa 2%, fruktosa 2% maupun sukrosa 2% yang ditambahkan ke dalam masing-masing pengencer skim kuning telur terhadap motilitas spermatozoa dan persentase spermatozoa hidup.

Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, saran yang dapat diberikan adalah :

1. karbohidrat jenis glukosa, fruktosa dan sukrosa dapat digunakan sebagai sumber energi dalam pengencer skim kuning telur;
2. perlu diadakan penelitian lebih lanjut terhadap pemberian berbagai sumber karbohidrat ke dalam jenis pengencer berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Aisen, E.G., V.H. Medina and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalosa concentrations. *Theriogenology*. 57: 1801--1808.

- Aminasari, D.P. 2009. Pengaruh umur pejantan terhadap kualitas semen beku sapi limousin. <http://elibrary.ub.ac.id/bitstream/123456789/21674/1/Pengaruh-umur-pejantan-terhadap-kualitas-semen-beku-sapi-limousin.pdf>. Diakses pada 18 November 2013
- Bakas, L.S. and E.A. Disalvo. 1991. Effects of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* 28: 347--353.
- BIB Ungaran. 2011. Instruksi kerja. Balai Inseminasi Buatan Ungaran. Jawa Tengah.
- BIBD Lampung Tengah. 2010. Standar Operasional Prosedur. BIBD Lampung Tengah. Lampung Tengah.
- Butar, E. 2009. Efektifitas Frekuensi Exercise Terhadap Peningkatan Kualitas Semen Sapi Simmental. <http://repository.usu.ac.id/bitstream/1/09E00898.pdf>. Diakses pada 5 November 2013. Direktorat Jenderal Peternakan.
2000. SNI 01.4869.1- 2005 Semen Beku Sapi.
- Feradis. 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animal* eds. 7th. Lippincott & Williams. Baltimore, Maryland, USA.
- Guntoro, S. 2008. Membudidayakan Sapi Bali. Kanisius. Yogyakarta.
- Hafez, E.S.E. 2000. Semen Evaluation in Reproduction In Farm Animals. 7th edition. Lippincott Wiliams and Wilkins. Maryland, USA.
- Hammersted, R. 1993. Maintenance of Bioenergetic in Sperm and Prevention of Lipid Peroxidation. M.J.D'occhio. Australia.
- Mansjur. 2001. Metabolisme: Karbohidrat, Protein, Asam Nukleat. Fakultas MIPA Institut Pertaian Bogor. Bogor.
- Maxwell WMC, and Salamon S. 1993. Liquid storage of ram sperm. *J. Of Anim. Reprod. Fert. Dev.* 5:613--618.
- _____. 2000. Storage of ram semen. *J. of Anim. Reprod. Sci.* 62: 77--111.
- Nalbandov, A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. UI Press. Jakarta.
- Nicollajsen H, A. Hvidt. 1994. Phase behaviour of the system trehalose NaCl water. *Cryobiology* 31:199--205.
- Nursyam. 2007. Perkembangan iptek bidang reproduksi ternak untuk meningkatkan produktivitas ternak http://www.unlam.ac.id./journal/pdf_file. Diakses pada 5 November 2013.
- Panglowpahan. 2003. Influence of glucose and fruktose in the extender during long term storage of chilled canine semen. *Theriogenology* 62: 1498 -- 1517.
- Poedjiadi, A. 1994. Dasar-dasar Biokimia. UI Press. Jakarta.
- Raharjo, D. 2002. Daya Tahan Spermatozoa Semen Cair Sapi FH dalam Kemasan Straw Mini Menggunakan Pengencer Citrat Kuning Telur dan Skim Kuning Telur dengan Penambahan Fruktosa. Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Rizal, M. 2006. Peranan beberapa jenis gula dalam meningkatkan kualitas semen beku domba Garut. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 11:123--130.
- _____. 2008. Peningkatan kualitas spermatozoa epididimis kerbau belang yang dikriopreservasi dengan beberapa konsentrasi sukrosa. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 188--183.
- Salisbury, G.W., N.L. Vandenmark., dan R. Djanuar. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. UGM Press. Jogjakarta.
- Samsudewa, D. dan A. Suryawijaya. 2008. Pengaruh Berbagai Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. 1: 88 – 92
- Steel RGD dan JH. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. Edisi II. Sumantri B, Penerjemah. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Susilawati, T., P. Srianto, Hermanto dan E.Yuliani. 2003. Inseminasi Buatan dengan spermatozoa beku hasil sexing pada sapi untuk mendapatkan anak dengan jenis kelamin sesuai harapan. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Toelihere, R. M. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- Toelihere, R. M. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- Woelders, H., A. Matthij and B. Engelan cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93—105.