

PENGARUH PEMBERIAN GLISEROL DALAM MEDIUM TRIS KUNING TELUR TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA SAPI ACEH SETELAH PEMBEKUAN

The Effect of Giving of Glycerol into Tris-Yolk Medium to the Aceh Cattle Spermatozoa after Freezing

Silvia Rizki¹, Dasrul², Hamdan², Juli Melia², Ginta Riady², Mulyadi Adam³

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

³Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala

E-mail: silviarizki_gadis@yahoo.com

ABSTRAK

Spermatozoa yang melalui proses pembekuan seringkali mengalami kerusakan karena terbentuknya kristal es. Pembentukan kristal es dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa pasca thawing terutama penurunan motilitas. Penambahan krioprotektan dalam pengencer dapat meminimalisir kerusakan sel. Salah satu jenis krioprotektan yang sering digunakan pada pembekuan semen adalah gliserol. Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh penambahan gliserol dalam pengencer Tris Kuning Telur (TKT) terhadap kualitas spermatozoa (motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU) sapi aceh yang disimpan dalam nitrogen cair. Desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 3 perlakuan dan 6 pengulangan. Pengamatan kualitas spermatozoa dilakukan setelah pembekuan di dalam nitrogen cair. Data dianalisis dengan uji Analysis of Variance (ANOVA) pola satu arah. Hasil kualitas spermatozoa pada masing-masing konsentrasi gliserol (3%, 5%, dan 7%) berturut-turut untuk hasil motilitas sebesar: $17,17 \pm 12,17\%$, $51,17 \pm 11,13\%$, dan $33,33 \pm 8,76\%$; hasil spermatozoa hidup sebesar: $22,50 \pm 15,41\%$, $56,33 \pm 8,98\%$, dan $42,50 \pm 6,35\%$; hasil MPU sebesar: $31,42 \pm 17,90\%$, $61,50 \pm 10,82\%$, dan $42,50 \pm 12,14\%$. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penambahan gliserol dalam pengencer Tris Kuning Telur dapat mempertahankan kualitas spermatozoa (motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU) sapi aceh setelah pembekuan. Penambahan gliserol dengan konsentrasi 5% dalam pengencer Tris Kuning Telur paling baik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa sapi aceh dibandingkan dengan konsentrasi 3% dan 7%.

Kata kunci: sapi aceh, gliserol, tris kuning telur (TKT), kualitas spermatozoa, pembekuan.

ABSTRACT

Freezing spermatozoa are often experiencing the damage by the formation of ice crystal. The formation of ice crystal leads to the quality reduction of post-thawing spermatozoa especially reducing motility. The addition of cryoprotectant in the diluent can minimize cell damage. One of the most common cryoprotectant type that was used in sement freezing is glycerol. This research aims to examine the influence of the addition of glycerol in tris-yolk, or known as Tris Egg Yolk (TKT) to the quality of spermatozoa (motility, live spermatozoa, and MPU) of aceh cattles stored in liquid nitrogen. The research design used in this research is a completely randomized design, that consists of three treatments and six repetitions. Quality of spermatozoa observation were performed after freezing process in the liquid nitrogen. Data were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) with one tail pattern. The result of spermatozoa quality in each concentration of glycerol (3%, 5%, and 7%) respectively for the motility as follows: $17.17 \pm 12.17\%$; $51.17 \pm 11.13\%$; and $33.33 \pm 8.76\%$; result of live spermatozoa as follows: $22.50 \pm 15.41\%$; $56.33 \pm 8.98\%$; and $42.50 \pm 6.35\%$; result of MPU as follows: $31.42 \pm 17.90\%$; $61.50 \pm 10.82\%$; and $42.50 \pm 12.14\%$. Based on the result, the conclusion is that the addition of glycerol in the tris-yolk can maintain the quality of spermatozoa (motility, live spermatozoa, and MPU) of aceh cattle after freezing. The addition of glycerol with 5% concentration in the tris-yolk dilator is the best concentration to maintain the quality of spermatozoa aceh cattle, compared to the 3% and 7% concentration.

Keywords: aceh cattle, glycerol, tris egg yolk (TKT), spermatozoa quality, freezing.

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Sapi aceh merupakan salah satu rumpun sapi potong lokal Indonesia yang mempunyai daya tahan terhadap lingkungan yang buruk seperti krisis pakan, air, penyakit parasit dan temperatur panas (Gunawan, 1998). Namun populasi sapi aceh cenderung menurun dari tahun ke tahun. Oleh karena itu, saat ini perlu dilakukannya usaha untuk meningkatkan kembali populasi sapi aceh.

Salah satu teknologi reproduksi yang efektif dan efisien untuk percepatan peningkatan populasi sapi aceh adalah aplikasi teknologi Inseminasi Buatan (IB) menggunakan semen beku sapi aceh unggul. Namun aplikasi IB pada sapi aceh masih menemukan beberapa kendala, terutama menyangkut penyediaan semen beku sapi aceh secara berkesinambungan dan belum ditemukannya pengencer yang tepat untuk mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa setelah pembekuan.

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel, reaksi metaboliknya berhenti mendekati total (Susilawati, 2000). Masalah utama yang sering dihadapi dalam proses pembekuan semen adalah pengaruh *cold shock* terhadap sel yang dibekukan dan perubahan-perubahan intraseluler akibat pengeluaran air, yang berhubungan dengan pembentukan kristal-kristal es dan penumpukan elektrolit didalam larutan atau didalam sel. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein dinding sel spermatozoa dan pada waktu *thawing*, permeabilitas membran sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel (Toelihere, 1993). Kelemahan ini sebagian dapat diatasi dengan menggunakan zat-zat pelindung (krioprotektan) di dalam pengencer. Keefisienan krioprotektan selama proses pembekuan sangat dipengaruhi oleh konsentrasi yang ditambahkan dalam media pengencer (Afriantini dkk., 2007).

Gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa (Susilawati, 2011). Penggunaan gliserol harus memperhatikan konsentrasi yang tepat, agar dapat berfungsi dengan baik. Apabila konsentrasi kurang, daya protektif gliserol tidak akan optimal, sebaliknya apabila berlebih akan menjadi toksik bagi spermatozoa (Rizal dan Herdis, 2010). Mumu (2009) menjelaskan dengan adanya gliserol dalam pengencer, maka efek dari kejutan dingin dapat meminimalisir kematian spermatozoa, gliserol dapat mencegah terjadinya dehidrasi karena memiliki daya pengikat air yang kuat. Sifat demikian mempengaruhi tekanan uap sehingga titik beku medium akan menurun.

Selain gliserol, tersedia pula beberapa bahan krioprotektan lain yang dapat digunakan sebagai zat pelindung spermatozoa selama pembekuan, diantaranya adalah DMA (*dimethyl acetamide*), DMF (*dimethyl formamide*), DMSO (*dimethyl sulfoxide*), etilenglikol, dan propilenglikol (Hammerstedt dan Graham, 1992).

Kondisi spermatozoa yang mudah mengalami kerusakan pada saat perlakuan maupun penyimpanan membutuhkan pengencer yang dapat mempertahankan kualitas selama penyimpanan, maka pengencer harus mengandung sumber nutrisi, *buffer*, anti *cold shock*, antibiotik dan krioprotektan yang dapat melindungi spermatozoa dalam proses pendinginan dan pembekuan (Toelihere, 1993). Salah satu bahan pengencer yang dapat digunakan untuk pengenceran semen sapi adalah Tris Kuning Telur (TKT). Pengencer tris mengandung asam sitrat dan fruktosa yang berperan sebagai penyangga (*buffer*), untuk mencegah perubahan pH akibat asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa serta mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. Manfaat kuning telur terletak pada lipoprotein dan lesitin yang melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa serta mengandung sumber energi seperti protein, karbohidrat, dan vitamin yang dapat melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Djanuar, 1985).

Saat ini, penggunaan gliserol sebagai bahan krioprotektan sudah sangat diminati para peneliti. Setiono dkk. (2015) melaporkan bahwa penggunaan gliserol dalam pengencer tris sitrat kuning telur dengan konsentrasi 6% memberikan hasil yang baik bagi motilitas dan persentase spermatozoa hidup sapi Brahman setelah pembekuan. Sampai saat ini belum diketahui konsentrasi gliserol yang tepat untuk ditambahkan dalam media pengencer tris kuning telur untuk proses pembekuan semen sapi aceh.

Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan suatu penelitian untuk mengkaji lebih dalam tentang penambahan konsentrasi gliserol yang optimal pada pengencer tris kuning telur dalam mempertahankan kualitas semen sapi aceh setelah pembekuan.

MATERIAL DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola searah dengan 3 kelompok perlakuan penggunaan dosis gliserol berbagai konsentrasi (3%; 5% dan 7%) dalam pengencer tris kuning telur. Setiap kelompok perlakuan diulang sebanyak 6 kali. Hewan yang dipergunakan sebagai sumber semen adalah 1 ekor sapi aceh jantan dewasa dengan umur 3-4 tahun dengan bobot badan berkisar 350 kg. Sapi pejantan ditempatkan dalam kandang individu yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum. Pakan yang diberikan berupa hijauan segar sebanyak 10% BB dan konsentrat sebanyak 1% BB dengan pemberian dua kali dalam sehari, serta air minum yang diberikan secara *ad libitum*. Semen ditampung dengan cara menggunakan vagina buatan. Penampungan semen dilakukan pada pagi hari jam 08.00-09.00 WIB, sebanyak 1 kali dalam seminggu, setiap penampungan dilakukan dua kali ejakulasi. Prosedur penampungan semen dilakukan menggunakan metode vagina buatan.

Peralatan yang digunakan meliputi peralatan *freezing*, vagina buatan sapi lengkap, rak straw, mini straw 0,25ml, *thawing box*, kontainer nitrogen cair, kontainer depo, *haemocytometer* lengkap, mikroskop lengkap monitor, pipet tetes, spuit insulin, *object glass*, *cover glass*, labu erlenmeyer, timbangan digital, tabung reaksi, kertas saring, aluminium foil, kertas label, gelas ukur, pinset, gunting, indikator pH, rak tabung reaksi, *tissue*, dan kapas. Bahan yang digunakan adalah semen segar sapi aceh, tris kuning telur, gliserol, pewarna eosin 0,2%, NaCl fisiologis, aquabides, pelicin, alkohol 70%, natrium sitrat, larutan hypoosmotik 0,032 M (dibuat dari 7,35gr Na Citrat 2H₂O, 13,52gr fruktosa yang dilarutkan dalam 1 liter aquades), nitrogen cair, *penisilin* dan *streptomycin*.

Pengencer semen yang digunakan dalam penelitian ini di buat dari tris kuning telur yang memiliki komposisi dari tris (3,049 g), asam sitrat (1,70 g), fruktosa (1,25 g), ditambahkan dengan kuning telur 20%, dan antibiotik *penisilin* dan *streptomycin* 1%, kemudian dilarutkan ke dalam 100 ml aquabidest steril. Pengencer dibuat sebanyak 100 ml masing-masing kelompok. Pengencer ini dibuat dengan perbandingan 4:1 (80 ml tris + 20 ml kuning telur). Selanjutnya bahan pengencer semen yang sudah disiapkan ini disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 5°C sampai digunakan. Penambahan gliserol dilakukan dengan konsentrasi yang berbeda kedalam semen yang sudah diencerkan dengan pengencer tris kuning telur. konsentrasi gliserol yang diberikan sesuai dengan kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan pertama (K1) menggunakan konsentrasi gliserol 3% (pengencer tris kuning telur 97 ml + 3 ml gliserol); pada perlakuan kedua (K2) menggunakan konsentrasi gliserol 5% (pengencer tris kuning telur 95 ml + 5 ml gliserol); dan sedangkan pada perlakuan ketiga (K3) digunakan konsentrasi gliserol 7% (pengencer tris kuning telur 93 ml + 7 ml gliserol).

Setelah penampungan semen, segera dilakukan pemeriksaan kualitas semen secara makroskopis (volume, warna, konsistensi, bau, dan pH) dan mikroskopis (gerakan massa, konsentrasi, persentase motilitas, viabilitas, abnormalitas, dan membran plasma utuh (MPU) spermatozoa. Semen yang mempunyai konsentrasi spermatozoa $>600 \times 10^6/\text{ml}$ dan motilitas progresif $>70\%$, abnormalitas $<20\%$ digunakan sebagai sampel (Toelihere, 1985).

Semen yang telah dikemas di dalam straw mini (0,25 ml) dengan konsentrasi 25 juta spermatozoa motil per straw, kemudian disusun pada rak khusus dan dimasukkan kedalam *cool top* selama 4 jam. Selanjutnya dilakukan *free freezing* terhadap straw tersebut dengan membekukannya secara vitrifikasi pada uap nitrogen cair (4cm diatas permukaan nitrogen cair) hingga suhu mencapai -110°C s/d -120°C selama 12-14 menit. Selanjutnya straw tersebut disimpan di dalam container yang berisi nitrogen cair pada suhu -196°C . Setelah penyimpanan selama 1 minggu, masing-masing sampel spermatozoa beku perlakuan dicairkan kembali (*thawing*) untuk dievaluasi kualitasnya. *Thawing* dilakukan dengan cara memasukkan straw ke dalam air bersuhu 37°C (di dalam penangas air) selama 30 detik. Parameter kualitas spermatozoa yang diamati adalah: persentase motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan

persentase integritas membran plasma utuh (MPU) spermatozoa masing-masing setelah tahap pembekuan atau pencairan kembali (*thawing*).

Analisis Data

Data kualitas spermatozoa hasil penelitian ini dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) *one way* dan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji banding (Duncan) untuk menentukan perbedaan antar perlakuan (Gaspersz, 1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebagai dasar untuk menentukan kelayakan semen untuk diolah adalah hasil evaluasi kualitas segar. Persyaratan yang harus dipenuhi agar semen segar layak diolah meliputi volume dan pH semen, gerakan massa, konsentrasi, motilitas progresif, dan abnormalitas sperma serta sejumlah ukuran biokimia lainnya. Berdasarkan evaluasi semen segar, sapi aceh yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini dinyatakan dalam kondisi yang baik sehingga dapat dilakukan pengolahan semen lebih lanjut. Hasil evaluasi semensegar disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata ($\pm$ SD) evaluasi semen segar sapi aceh

Parameter	Hasil Pengamatan
Volume (ml)	4,32 $\pm$ 0,70
Warna	Krem keputih-putihan
Konsistensi	Sedang sampai kental
pH	6,93 $\pm$ 0,16
Bau	Khas spermatozoa
Gerak massa	++
Motilitas (%)	75,00 $\pm$ 5,48
Konsentrasi (10^9 / ml)	1,21 $\pm$ 0,09
Spermatozoa Hidup (%)	81,00 $\pm$ 2,83
Abnormalitas (%)	7,50 $\pm$ 1,05
MPU (%)	85,85 $\pm$ 1,91

Berdasarkan hasil penilaian semen segar pada Tabel 1, dapat disimpulkan bahwa semen segar sapi aceh yang digunakan pada penelitian ini mempunyai kategori baik dan memenuhi syarat untuk digunakan sebagai sampel semen untuk dibekukan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Toelihere (1985) dan Balai Inseminasi Buatan Dirjen Peternakan bahwa terdapat beberapa persyaratan yang harus dipenuhi dalam proses pendinginan atau pembekuan semen adalah perkiraan motilitas minimal 70%, konsentrasi lebih dari 2.000 juta per ml semen dan persentase hidup spermatozoa minimal 75%, abnormalitas tidak lebih dari 20%, dan semen memiliki gerakan massa ++/+++ (Aslam dkk., 2014).

Data rerata persentase kualitas spermatozoa dalam pengencer Tris Kuning Telur dengan konsentrasi gliserol yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata ($\pm$ SD) kualitas semen Sapi aceh setelah pembekuan

Parameter Penilaian	Perlakuan Gliserol		
	P1 (3%)	P2 (5%)	P3 (7%)
Motilitas Spermatozoa	17,17 $\pm$ 12,17 ^c	51,17 $\pm$ 11,13 ^a	33,33 $\pm$ 8,76 ^b
Spermatozoa Hidup	22,50 $\pm$ 15,41 ^c	56,33 $\pm$ 8,98 ^a	42,50 $\pm$ 6,35 ^b
MPU Spermatozoa	31,42 $\pm$ 17,90 ^c	61,50 $\pm$ 10,82 ^a	42,50 $\pm$ 12,14 ^b

Ket: ^{a,b,c,d} Superskrip huruf yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$)

Perbandingan sperma hidup yang bergerak kedepan dengan konsentrasi sperma total dalam semen menunjukkan persentase sperma motil progresif (Evans dan Maxwell, 1987). Data pengamatan motilitas spermatozoa selama pembekuan dalam pengencer tris kuning telur dengan konsentrasi gliserol yang berbeda dapat dilihat pada tabel 1, dimana pada P1 dengan konsentrasi gliserol 3% menunjukkan hasil sebesar 17,17%; sedangkan pada P2 dengan konsentrasi gliserol 5% menunjukkan hasil sebesar 51,17%; serta pada P3 dengan konsentrasi gliserol 7% mendapatkan hasil sebesar 33,33%. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan memberikan pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap motilitas spermatozoa. Namun demikian terlihat adanya kecenderungan bahwa konsentrasi gliserol 5% berpengaruh lebih baik, dibanding konsentrasi gliserol yang lain. Hal ini sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Mumu (2009) yang juga menggunakan konsentrasi gliserol 3%, 5%, dan 7% untuk melihat motilitas dari semen sapi simental dan hasil terbaik pada konsentrasi gliserol 5%. Namun hal ini berbeda dengan hasil yang didapat oleh Salmah (2014) yang mengatakan bahwa motilitas semen sapi bali yang diencerkan dengan pengencer Andromed memiliki nilai $50,8 \pm 6,14$ yang lebih baik daripada motilitas semen yang diencerkan dengan pengencer tris kuning telur setelah pembekuan yaitu sebesar $25,8 \pm 4,43$.

Data hasil analisis ragam pemeriksaan spermatozoa hidup setelah pembekuan dalam pengencer tris kuning telur dengan konsentrasi gliserol yang berbeda menunjukkan bahwa setiap perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap persentase spermatozoa hidup. Dimana pada konsentrasi gliserol 3% (P1) mendapatkan hasil sebesar 22,50%; dan pada konsentrasi gliserol 5% (P2) hasilnya sebesar 56,33%; dan pada konsentrasi gliserol 7% (P3) sebesar 42,50%. Dapat dilihat bahwa hasil persentase spermatozoa hidup yang terbaik yaitu pada pemberian gliserol dengan konsentrasi 5%. Hasil penilaian ini tidak terlalu berbeda dengan pendapat Setiono (2015) yang mengatakan bahwa persentase spermatozoa hidup dari semen sapi brahman yang diencerkan dengan pengencer tris sitrat kuning telur dengan penambahan gliserol sebanyak 6% memiliki hasil yang terbaik yaitu sebesar 55,52%.

Integritas membran plasma adalah suatu keadaan yang menunjukkan fungsi fisiologis membran yang terjaga sebagai kontrol terhadap transport air sehingga cairan di luar sel tidak dapat memasuki sel. Untuk mengetahui integritas membran spermatozoa maka dilakukan *Hypo-osmotic Swelling (HOS) Test*. Nilai membran plasma utuh spermatozoa sapi aceh pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1, dimana pada konsentrasi gliserol 3%, 5%, dan 7% masing-masing didapatkan hasil rerataannya adalah 31,42%; 61,50%; dan 42,50%. Dari hasil analisis ragam menunjukkan bahwa masing-masing perlakuan memberikan perlakuan yang nyata ($P < 0,05$) terhadap nilai membran plasma utuh pada semen sapi setelah pembekuan. Namun, terlihat pada konsentrasi gliserol 5% (P2) menunjukkan hasil terbaik yaitu sebesar 61,50% dibandingkan konsentrasi gliserol 3% dan 7%. Hal ini berbeda dengan pendapat Farina (2011) yang mengatakan bahwa konsentrasi gliserol 6% memberikan hasil terbaik pada persentase membran plasma utuh (MPU) sapi pesisir setelah pembekuan. Nilai persentase MPU spermatozoa berkorelasi positif dengan fertilitas pejantan, semakin tinggi persentase MPU spermatozoa maka semakin tinggi pula daya fertilitas, demikian pula sebaliknya (Muzakkir dkk., 2017).

PENUTUP

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa konsentrasi gliserol yang ditambahkan dalam medium tris kuning telur berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa sapi aceh setelah pembekuan. Pemberian konsentrasi gliserol 5% dalam pengencer tris kuning telur menghasilkan kualitas spermatozoa (motilitas, spermatozoa hidup, dan MPU spermatozoa) sapi aceh yang lebih baik setelah pembekuan dibandingkan dengan konsentrasi gliserol 3% dan 7%.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut lagi mengenai daya fertilitas spermatozoa sapi aceh dengan pemberian gliserol dengan berbagai konsentrasi melalui IB pada induk betina birahi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriantini, R.I., Irnan. S., dan San. S. 2007. Penentuan Waktu Equilibrasi pada Pembekuan Semen Kuda Menggunakan Bahan Pengencer Susu Skim. *Animal Production* 9(3): 145-152.
- Aslam, H.A., Dasrul., dan Rosmaidar. 2014. Pengaruh Penambahan Vitamin C Dalam Pengencer Andromed Terhadap Persentase Motilitas Dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pembekuan. *Jurnal Medika Veterinaria* 8(1): 20-26.
- Djanuar. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. *Salamons Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths: Sidney.
- Farina, Y. 2011. Pengaruh Pengencer Tris Kuning Telur, Tris Susu Skim Dan Tris Susu Yang Disuplementasi Dengan Gliserol 6% Terhadap Kualitas Semen Sapi Pesisir. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Andalas. Padang.
- Feradis. 2010. *Bioteknologi Reproduksi pada Ternak*. Alfabeta: Bandung
- Gaspersz, V. 1991. *Metode Perancangan Percobaan*. Armico, Bandung.
- Gunawan. 1998. *Upaya Peningkatan Mutu Genetik Sapi Aceh*. Pidato Pengukuhan dalam Jabatan Guru Besar Etap Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala.
- Hammerstedt, R. dan J.K. Graham. 1992. Cryopreservation of Poultry Semen: The Enigma of Glycerol. *Cryobiol.* 29: 26 – 38.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental Yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Journal Agroland* 16 (2) : 172-179.
- Muzakkir., Dasrul., Sri. W., Muslim. A., dan Mustafa. S. 2017. Pengaruh Lama Ekuilibrasi Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Aceh Setelah Pemebekuan Menggunakan Pengencer Andromed. *Jurnal Ilmiah Peternakan* 5(2): 155-128.
- Rizal. M dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa*. 20(13): 140.
- Salmah. N. 2014. Motilitas, Persentase Hidup Dan Abnormalitas Spermatozoa Semen Beku Sapi Bali Pada Pengencer Andromed Dan Tris Kuning Telur. *Skripsi*. Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
- Setiono, N., Sri. S., dan Purnama. E.S. 2015. Kualitas Semen Beku Sapi Brahman Dengan Dosis Krioprotektan Gliserol Yang Berbeda Dalam Bahan Pengencer Tris Sitrat Kuning Telur. *Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu* 3(2): 61-69.
- Susilawati. T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadexs dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *Disertasi*. Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. UB Press: Malang.
- Toelihere, M.R. 1985. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Angkasa: Bandung.
- Toelihere, M.R. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa: Bandung.