

PEMBEKUAN VITRIFIKASI SEMEN KAMBING BOER DENGAN TINGKAT GLISEROL BERBEDA

Moh Nur Ihsan
Bagian Produksi Ternak Fakultas Peternakan UB Malang

ABSTRAK

Suatu penelitian dengan tujuan untuk mengetahui kualitas spermatozoa kambing pada penambahan konsentrasi gliserol yang berbeda dalam pengencer telah dilakukan dan diharapkan dapat menentukan kadar gliserol yang tepat untuk mempertahankan kualitas spermatozoa kambing hasil pembekuan secara vitrifikasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian gliserol memberikan pengaruh berbeda terhadap motilitas spermatozoa pasca thawing, yaitu 0% ($30,00 \pm 12,25\%$), 7% ($30,00 \pm 12,65\%$), 14% ($13,33 \pm 9,31\%$) dan 21% ($7,50 \pm 2,74\%$). Pengencer Andromed tanpa penambahan gliserol dapat memberikan motilitas individu *post thawing* yang lebih baik dibandingkan dengan penambahan gliserol 7%, 14% dan 21%. Dengan demikian untuk pengencer Adromed disarankan untuk tidak perlu dilakukan penambahan gliserol lagi, untuk pembekuan semen kambing karena mampu mempertahankan motilitas spermatozoa *post thawing*.

Kata Kunci: kualitas semen kambing, pembekuan vitrifikasi dan gliserol

GOAT SEMEN QUALITY WITH VITRIFICATION FREEZING USE DIFFERENT LEVEL OF GLYCEROL

ABSTRACT

A study with the aim to determine the quality of goat spermatozoa at different concentrations of glycerol in the diluent has been done and is expected to determine appropriate levels of glycerol to maintain the quality of goat spermatozoa by vitrification freezing results. The results showed that administration of glycerol gives a different effect on sperm motility after thawing, that is 0% ($30.00 \pm 12.25\%$), 7% ($30.00 \pm 12.65\%$), 14% ($13.33 \pm 9,31\%$) and 21% ($7.50 \pm 2.74\%$). Andromed without the addition of glycerol diluent can provide individual motility post-thawing better than the addition of glycerol 7%, 14% and 21%. It could be concluded that andromed advised not need the addition of glycerol again, for freezing goat semen to maintain sperm motility post-thawing.

Key words: goat semen quality, vetrifivcation freezing and Glycerol.

PENDAHULUAN

Semen segar yang telah ditampung segera dilakukan pengenceran dengan bahan pengencer untuk mempertahankan kualitas semen selama penyimpanan. Pengenceran juga dapat memberi perlindungan terhadap *cold shock* yang terjadi pada saat pembekuan dan sebagai penyanggah untuk menjaga kestabilan pH (Mumu, 2009). Andromed merupakan pengencer komersial dasar bebas protein hewani (Herdis, dkk., 2008). Bahan pengencer instant ini berupa cairan tersusun atas *aquabidest*, fruktosa, gliserol, asam sitrat, *buffer*, *phosfolipid*, *spectynomycine*, *lincomycine*, *tylocin*, dan *gentamycin* (Susilawati, 2011). Dalam proses pembekuan, semen perlu ditambahkan krioprotektan untuk melindungi dari efek negatif pembekuan. 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, 2010).

Pembekuan semen adalah suatu proses penghentian sementara kegiatan hidup dari sel tanpa mematikan fungsi sel (Mumu, 2009). Salah satu teknik yang bisa digunakan yaitu vitrifikasi. Prinsip dari metode vitrifikasi adalah terjadi peningkatan viskositas larutan dan membutuhkan *cooling* dan *warming rate* yang cepat tetapi dalam batas-batas tertentu, ataupun menggunakan medium krioprotektan yang mana akan menekan pembentukan viskositas pada temperatur rendah (Anonymous, 2011^b). Metode ini sudah dipakai untuk membekukan sel telur dan embrio sehingga bisa dipakai

kemudian dalam teknik bayi tabung. Ketika dicairkan, ternyata kebanyakan sel telur dan embrio lebih bertahan dengan vitrifikasi dibandingkan teknik pembekuan lambat (Maulanar, 2011). Metode ini sudah dipakai untuk membekukan sel telur dan embrio. Ketika dicairkan, ternyata kebanyakan sel telur dan embrio lebih bertahan dengan vitrifikasi dibandingkan teknik pembekuan lambat (Maulanar, 2011).

Krioprotektan adalah zat kimia non elektrolit yang berperan dalam mengurangi pengaruh mematikan selama pembekuan baik berupa pengaruh larutan maupun adanya pembentukan kristal es sehingga viabilitas sel dapat dipertahankan. Berdasarkan sifat-sifat fisikokimia dan daya permeabilitas membran maka krioprotektan dibagi atas dua kelompok, yaitu (i) krioprotektan intraseluler, dapat keluar masuk membran karena memiliki berat molekul kecil sehingga bersifat permeabel (contoh: gliserol, etilen glikol, propanadiol), dan (ii) krioprotektan ekstraseluler, tidak dapat keluar masuk membran karena memiliki berat molekul besar sehingga bersifat non permeabel (contoh: protein, sukrosa, manosa, rafinosa, kuning telur, susu). Krioprotektan yang paling banyak digunakan dalam pembekuan semen hewan mamalia yaitu gliserol (Gazali dan Tambing, 2001). Bagi dunia peternakan dan kedokteran hewan diperlukan suatu metode yang praktis dan aplikatif di lapangan, sehingga metode vitrifikasi dapat menjadi suatu alternatif.

Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian kualitas spermatozoa kambing Boer hasil pembekuan secara vitrifikasi dalam medium Andromed dan TRIS kuning telur

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kualitas spermatozoa kambing

Boer pada penambahan konsentrasi gliserol yang berbeda dalam medium Andromed hasil pembekuan dan diharapkan dapat menentukan kadar gliserol untuk mempertahankan kualitas spermatozoa kambing hasil pembekuan secara vitrifikasi.

METODE PENELITIAN

Materi Penelitian

Materi penelitian yang digunakan adalah semen segar kambing Boer dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Pengenceran dilakukan dengan menambahkan gliserol 0% (P0), 7% (P1), 14% (P2), 21% (P3). Pengamatan dilakukan setelah pengenceran, kemudian dilakukan *pre-freezing* di atas nitrogen cair selama 5 menit dan dicelupkan ke dalam nitrogen cair. *Thawing* dilakukan dengan menggunakan air suhu 37-38°C selama 1 menit, dan diamati kualitas semen setelah *thawing*.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan metode percobaan yang dirancang dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan. Jika terdapat perbedaan yang nyata atau sangat nyata, maka dilakukan pengujian selanjutnya menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Kualitas Semen Segar

Pemeriksaan kualitas semen segar dilakukan dengan cara melakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis yang dilakukan meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH, sedangkan pengamatan secara mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, spermatozoa hidup, spermatozoa abnormal. Rata-rata hasil

pemeriksaan kualitas semen segar dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas semen segar kambing

| Variabel | Rata-rata \pm SD |
|----------------------------------|-------------------------|
| Volume (ml) | 0,82 \pm 0,27 |
| pH | 7 \pm 0,00 |
| Warna | Putih kekuningan – Krem |
| Konsistensi | encer – kental |
| Motilitas massa | +++ |
| Motilitas individu (%) | 70 \pm 0,00 |
| Spermatozoa hidup (%) | 89,75 \pm 4,39 |
| Spermatozoa abnormal (%) | 7,83 \pm 1,78 |
| Konsentrasi ($\times 10^6$ /ml) | 3298 \pm 530,79 |

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa rata-rata semen segar kambing yang digunakan dalam penelitian memiliki kualitas dan kuantitas yang baik. Volume semen segar yaitu 0,82 \pm 0,27 ml dalam penelitian ini masih berada dalam kisaran normal. Hasil penelitian Kostaman dan Utama (2006) menunjukkan bahwa kambing Boer menghasilkan volume rata-rata 0,8 \pm 0,2 ml. Sulistyani (2006) dalam penelitiannya juga menunjukkan bahwa rata-rata volume semen segar kambing Boer yaitu 1,03 \pm 0,10 ml.

Derajat keasaman (pH) rata-rata semen segar kambing Boer yaitu 7 \pm 0,00. Menurut Greyling dan Grobelaar (1983) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa pH semen segar kambing Boer 6,40 \pm 0,02 ditampung dengan vagina buatan. Hal ini menunjukkan bahwa pH semen segar yang digunakan dalam penelitian masih berada dalam kisaran normal. Warna semen segar kambing Boer G1 yaitu putih kekuningan - krem. Berdasarkan hasil penelitian Kostaman dan Utama (2006) warna semen segar kambing Boer yaitu putih-krem. Wattimena

(2006) menjelaskan warna krem disebabkan oleh adanya sekresi pigmen riboflavin oleh kelenjar vesikularis dengan konsistensi kental dan berbau khas.

Konsistensi (derajat kekentalan) semen segar kambing Boer encer-kental, sesuai dengan hasil penelitian Kostaman dan Utama (2006) menunjukkan konsistensi semen segar kambing Boer yaitu encer-kental. Menurut Partodiharjo (1982) semen yang baik derajat kekentalannya hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu. Hal ini menunjukkan kualitas semen segar yang digunakan dalam penelitian ini masih baik.

Motilitas massa semen segar kambing Boer G1 yaitu +++ menunjukkan semen segar yang digunakan masih baik. Kostaman dan Utama (2006) melaporkan motilitas massa semen segar rata-rata yaitu ++. Hasil penelitian Sonjaya, dkk. (2005) menunjukkan motilitas massa semen segar kambing Boer rata-rata yaitu +++. Hasil penelitian Kostaman, dkk. (2004) menunjukkan motilitas massa semen segar kambing Boer G1 yaitu ++ - +++. Tolihere (1981) menjelaskan bahwa kualitas semen tergolong sangat baik jika gerakan masa spermatozoa (+++) terlihat gelombang-gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bagaikan gumpalan awan hitam yang bergerak cepat berpindah-pindah, dan tergolong baik jika gerak massa spermatozoa (++) apabila terlihat gelombang-gelombang kecil, tipis, kurang jelas, dan bergerak lamban.

Motilitas individu rata-rata yaitu $70\pm 0,00\%$. Nilai tersebut menunjukkan bahwa rata-rata motilitas semen segar kambing Boer G1 masih baik. Menurut Kostaman dan Utama (2006) dalam penelitiannya melaporkan rata-rata motilitas individu semen segar kambing Boer yaitu

$71,67\pm 3,72\%$. Hasil penelitian Kostaman, dkk. (2004) menunjukkan rata-rata motilitas individu semen segar kambing Boer yaitu $72,9\pm 1,08\%$. Persyaratan umum spermatozoa yang akan dibekukan minimal memiliki persentase motilitas minimal 70% (Anonymous, 2011^b). Salisbury dan Vandenmark (1985) menjelaskan bahwa semen segar dikatakan normal apabila semen tersebut mengandung spermatozoa yang memperlihatkan daya gerak aktif dan gerakan bergelombang.

Spermatozoa hidup kambing Boer G1 rata-rata yaitu $89,75\pm 4,39\%$ masih tergolong baik, sesuai dengan Kostaman dan Utama (2006) yang melaporkan spermatozoa hidup kambing Boer yaitu $77,29\pm 5,11\%$. Hasil penelitian Kostaman, dkk. (2004) menunjukkan rata-rata spermatozoa hidup sebesar $77,72\pm 1,82\%$. Hasil penelitian Sulistyani (2006) menunjukkan rata-rata spermatozoa hidup sebesar $85,88\pm 1,17\%$.

Rata-rata spermatozoa abnormal yaitu $7,83\pm 1,78\%$. Nilai ini masih menunjukkan kualitas semen masih dalam kisaran normal. Menurut Toelihere (1981) persentase abnormalitas di atas 25% menunjukkan fertilitas yang rendah. Hasil penelitian Kostaman dan Utama (2006) melaporkan spermatozoa abnormal kambing Boer yaitu $7,3\pm 1,4\%$. Kostaman, dkk. (2004) menyebutkan dalam penelitiannya rata-rata spermatozoa abnormal sebesar $8,04\pm 0,34\%$.

Konsentrasi semen segar kambing Boer rata-rata yaitu $3298\pm 530,79 \times 10^6/\text{ml}$. Hasil penelitian Kostaman dan Utama (2006) konsentrasi semen segar kambing Boer rata-rata yaitu $2,73\pm 0,55 \times 10^9/\text{ml}$. Kostaman, dkk. (2004) melaporkan rata-rata konsentrasi semen segar kambing Boer sebesar $2740\pm 0,04 \times 10^6/\text{ml}$. Sulistyani

(2006) dalam penelitiannya menyebutkan konsentrasi semen segar kambing Boer rata-rata $4164,6 \pm 161,82 \times 10^6/\text{ml}$.

Berdasarkan hasil pemeriksaan semen segar (Tabel 1) dapat disimpulkan bahwa semen segar yang digunakan dalam penelitian ini masih baik sehingga bisa diproses untuk dibekukan, sesuai dengan literatur yang menyebutkan bahwa persyaratan umum spermatozoa yang akan dibekukan minimal persentase motilitas 70%, konsentrasi 2×10^9 sel/ml, gerakan massa ++/ +++, persentase hidup minimal 80% dan persentase abnormal tidak lebih dari 15% (Anonimous, 2011^b).

Pemeriksaan Kualitas Semen Kambing Motilitas Individu Spermatozoa

Berdasarkan hasil analisis ragam menunjukkan pada penambahan gliserol 0% (P0), 7% (P1), 14% (p2), dan 21% (P3) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas individu spermatozoa setelah pengenceran dan setelah pembekuan. Hasil analisis nya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Motilitas spermatozoa pada kadar gliserol dan pengencer berbeda

| Pe- ngen- cer | Motilitas individu spermatozoa (%) | | | |
|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | PO | P1 | P2 | P3 |
| An- drom ed | 30.0± 12.25 ^a | 30.0± 12.65 ^a | 13.3± 9.31 ^b | 7.5± 2.74 ^c |

Keterangan: Notasi yang beda pada kolom sama menunjukkan adanya perbedaan

Berdasarkan Tabel 2 diketahui penambahan 0 dan 7 % gliserol dalam pengencer Andromed memiliki motilitas

individu yang paling tinggi setelah pengenceran dan setelah pembekuan.

Motilitas individu tertinggi terjadi pada spermatozoa dengan penambahan 0 dan 7% gliserol dalam pengencer Andromed. Hal ini memberikan informasi bahwa Andromed mampu menjaga kelangsungan hidup spermatozoa selama *processing* semen beku, sebab di dalam pengencer Andromed telah terkandung bahan-bahan yang dibutuhkan spermatozoa selama *processing* semen beku. Andromed mengandung fruktosa, asam sitrat, *buffer*, antibiotik dan gliserol, dimana semua bahan ini dibutuhkan untuk menunjang kehidupan spermatozoa selama *processing* semen beku.

Dalam pengencer Andromed sudah mengandung gliserol dan berfungsi sebagai krioprotektan intraseluler yang mampu melindungi spermatozoa selama *processing* semen beku. Hal ini karena gliserol dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa dan melindungi spermatozoa dari efek negatif pembekuan sesuai dengan Susilawati (2011) yang menjelaskan salah satu komposisi Andromed adalah gliserol. Gliserol merupakan krioprotektan intraseluler yang dapat berdifusi ke dalam sel-sel spermatozoa dan dapat dimetabolisir dalam proses-proses yang mampu menghasilkan energi dan membentuk fruktosa.

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.

Fruktosa merupakan sumber energi bagi spermatozoa dan juga berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler. Asam sitrat

berfungsi mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit. *Buffer* berfungsi sebagai penyanggah, menjaga keseimbangan pH. Antibiotik berfungsi untuk meminimalkan organisme *Vibrio foetus* serta akan meningkatkan daya tahan hidup spermatozoa (Susilawati, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian, dapat diketahui spermatozoa dengan penambahan gliserol dalam pengencer Andromed memberikan motilitas individu yang paling rendah yaitu $7,50 \pm 2,54\%$ setelah dibekukan secara vitrifikasi.

Hal ini sesuai dengan penelitian Mohamad, dkk. (2005) pada vitrifikasi ovarium mencit dengan menggunakan krioprotektan DMSO yang menunjukkan penggunaan krioprotektan DMSO sebesar 30% tidak ada ovarium yang berhasil tumbuh. Namun hal ini tidak sesuai dengan Rimayanti (2005) yang menjelaskan pada metode vitrifikasi, material yang akan dibekukan ditempatkan dalam media hiper-osmolaritas atau krioprotektan berkonsentrasi tinggi.

Rendahnya motilitas spermatozoa pada penambahan gliserol 21% dalam medium Andromed, diduga tidak cocok untuk kelangsungan hidup spermatozoa selama pengenceran dan pembekuan. Hal ini diduga karena penambahan 21% gliserol dalam pengencer Andromed, gliserol tersebut berubah menjadi toksik akibat dari proses metabolisme gliserol oleh spermatozoa. Menurut Mumu (2009) menambahkan kadar gliserol yang terlalu tinggi atau rendah tidak akan efektif menjalankan fungsi protektifnya. Rizal (2010) menambahkan penggunaan gliserol harus memperhatikan konsentrasi yang tepat agar dapat berfungsi dengan baik, apabila berlebih akan menjadi toksik bagi spermatozoa.

Dalam proses metabolisme fruktosa oleh spermatozoa akan menghasilkan energi dan sedikit asam laktat, namun apabila konsentrasi gliserol dalam pengencer berlebih/ terlalu tinggi, maka akan terbentuk lebih banyak asam laktat. Asam laktat ini dapat menurunkan pH dan bersifat racun bagi spermatozoa. Toelihere (1981) menjelaskan gliserol dimetabolisir dalam proses-proses yang menghasilkan energi dan membentuk fruktosa. Dalam keadaan aerob, gliserol berfungsi sebagai penghasil fruktosa dan sedikit asam laktat.

Menurut Gazali dan Tambing (2001) walaupun gliserol dapat memberikan perlindungan terhadap sel spermatozoa, namun dapat juga merusak struktur spermatozoa selama proses pembekuan semen, menyebabkan kejutan osmotik, dan menurunkan nilai antibiotika dalam pengencer semen.

Rendahnya nilai motilitas spermatozoa setelah pembekuan diduga terjadi akibat dari beberapa faktor. Faktor yang pertama yaitu waktu ekulibrasi kurang lama (belum optimal), Hal ini diduga karena waktu ekulibrasi yang dilakukan kurang lama, menyebabkan peresapan krioprotektan dalam spermatozoa belum sempurna sehingga terbentuk kristal es.; kedua, penambahan gliserol dilakukan pada akhir ekulibrasi sehingga perlindungan gliserol terhadap spermatozoa selama proses pengenceran dan pembekuan tidak maksimal sesuai dengan penelitian Yusuf, dkk. (2006) yang menunjukkan perlakuan penambahan gliserol pada akhir ekulibrasi tidak memperbaiki *post thawing motility* disebabkan waktu penambahan gliserol pada akhir ekulibrasi ke proses pembekuan terlalu singkat, sehingga efek perlindungan gliserol terhadap spermatozoa selama proses

pengenceran dan pembekuan tidak maksimal. Park dan Graham (1992) menjelaskan efek perlindungan gliserol yang diberikan kepada spermatozoa adalah memodifikasi kristal-kristal es yang terbentuk selama proses pembekuan serta tidak menyebabkan penumpukan elektrolit.

Penurunan motilitas spermatozoa setelah pembekuan juga bisa disebabkan karena terjadi kejutan osmotik pada saat spermatozoa dibekukan (terjadi penurunan suhu yang cepat) serta akibat terjadi pembentukan kristal es di dalam sel. Mumu (2009) menjelaskan gejala kejutan osmotik pada spermatozoa ditandai dengan kerusakan pada membran plasma sperma, sehingga proses metabolisme terganggu dan pada akhirnya menurunkan motilitas spermatozoa. Gazali dan Tambing (2001) menambahkan penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang halus di dalam sel yang mempunyai energi permukaan yang besar dan tidak stabil serta cenderung membentuk kristal es yang besar, kondisi ini akan mengakibatkan penurunan motilitas dan kematian sel. Pada penurunan suhu yang sangat cepat akan terbentuk kristal es yang halus di dalam sel dan cenderung membentuk kristal es yang besar.

Motilitas individu spermatozoa tertinggi yaitu pada perlakuan yang tidak dilakukan penambahan gliserol lagi dalam Andromed sebesar $30 \pm 12,25\%$ setelah pembekuan secara vitrifikasi. Nilai ini masih tergolong baik dan masih bisa digunakan untuk inseminasi buatan, sesuai dengan Campbell *et al* (2003) yang menyatakan bahwa batas minimal motilitas spermatozoa adalah sebesar 30%.

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan tidak perlu dilakukan penambahan gliserol lagi ke dalam pengencer

Andromed. Karena pengencer Andromed sudah mengandung gliserol dan bahan lainnya (fruktosa, asam sitrat, *buffer*, fosfolipid, dan antibiotik) yang mampu menjaga kelangsungan hidup spermatozoa kambing Boer selama proses pengenceran dan pembekuan secara vitrifikasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan: spermatozoa kambing *post thawing* dalam pengencer Andromed yang tanpa penambahan gliserol dan 7% gliserol, memiliki motilitas individu yang paling tinggi dibandingkan dengan penambahan gliserol 14% dan 21% setelah dibekukan secara vitrifikasi.

SARAN

Pada pengenceran dengan Andromed disarankan: tidak diperlukan penambahan gliserol lagi sehingga tidak perlu mengeluarkan biaya untuk membeli gliserol.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimous. 2011. Konsep Dasar Penyimpanan Semen Beku, (<http://vet-shop.blogspot.com/2011/06/konsep-dasar-penyimpanan-semen-beku.html>),
- Campbell, J.R., Kenealy, M.d, dan Campbell, K.L. 2003. Animal Science. 4th Ed. Mc Graw-Hill: New York.
- Gazali, M. dan Tambing. 2001. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. Hayati 9 (1) : 27-32.
- Kostaman, T., S. Keman, Sunardi, dan I.K. Utama. 2004. Penampilan Reproduksi Kambing Peranakan Etawah Betina Yang Dikawinkan Dengan Kambing Boer Jantan. Agrosains : 17 (3) : 299-311

- Kostaman, T. dan I.K. Utama. 2006. Studi Motilitas Dan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Boer Pada Pengencer Tris-Sitrat-Fruktosa. *J. Sain Veteriner* 24 (1) : 58-63.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental Yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *Journal Agroland* 16 (2) : 172-179.
- Nur Ihsan. M. 2009. Bioteknologi Reproduksi Ternak. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Partodiharjo, S. 1982. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara: Jakarta.
- Park, J.E. dan J.K. Graham. 1992. Effect of cryopreservation procedure on sperm membranes. *Theriogenology* 38 : 209-222.
- Rimayanti. 2005. Pengaruh Proses Vitrifikasi dengan Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Daya Hidup Oosit Sapi. *Media Kedokteran Hewan* 21 (1) : 28-31.
- Sonjaya, H., Sutomo, dan Hastuti. 2005. Pengaruh Penambahan Calcium Ionophore Terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Hasil Seksing. *J. Sains & Teknologi* 5 (2) : 90-101.
- Sulistiyani, N. 2006. Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Setelah Pembekuan Dengan Kadar Gliserol Yang Berbeda Pada Pengencer Susu Skim. Skripsi. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatology*. UB Press: Malang.
- Toelihere, M.R. 1981. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa: Bandung.
- Djanuar. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan Pada Sapi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Siregar. 2008. Ransum Ternak Ruminansia. Swadaya, Jakarta.
- Situmorang, P. 2002. The Effects of Inclusion of Exogenous Phospholipid In Tris- Diluent Containing A Different Level of Egg Yolk on the Viability of Bull Spermatozoa. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan dan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor 7 (3) : 131-187.
- Susilawati, T., Suyadi, Nuryadi, N. Isnaini dan S. Wahyuningsih. 1993. Kualitas Semen Sapi Fries Holland dan Sapi Bali Pada Berbagai Umur dan Berat Badan. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Toelihere, M. R. 1993. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Angkasa, Bandung.