

KUALITAS SEMEN SAPI LIMOUSIN SELAMA PENDINGINAN MENGGUNAKAN PENGECER CEP-2 DENGAN PENAMBAHAN BERBAGAI KONSENTRASI SANTAN

Pramudya Annisa Firdausi, Trinil Susilawati dan Sri Wahyuningsih

Bagian Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang

Email : trinil_susilawati@yahoo.com

ABSTRAK

Pelaksanaan penelitian dilakukan mulai tanggal 8 Mei 2014 sampai dengan 27 Mei 2014, kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari, Kabupaten Malang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi santan pada pengencer dasar CEP-2 terhadap kualitas semen Sapi Limousin selama pendinginan. Penelitian terbagi menjadi 4 perlakuan yaitu CEP-2 dengan penambahan 10% kuning telur, 5%, 10%, dan 15% santan (P0=CEP-2+10% KT, P1=CEP-2+5% S, P2=CEP-2+10% S, dan P3=CEP-2+15% S), P0 memperoleh hasil yang terbaik dan berbeda sangat nyata ($P<0,01$) dibandingkan perlakuan yang lain, bila diurutkan dari nilai tertinggi didapatkan P2, P1 dan P3. Pengencer yang mampu mempertahankan spermatozoa dan total spermatozoa motil yang paling baik yaitu CEP-2+ kuning telur 10% yang telah dianalisis menggunakan *Pearson's Chi-Square* dengan nilai harapan 40 juta sel spermatozoa/ml. Persentase motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa selama pendinginan pada CEP-2+ Santan memiliki perbedaan sangat nyata ($P<0,01$) lebih rendah daripada perlakuan dengan penambahan kuning telur. Penambahan berbagai konsentrasi santan pada CEP-2 tidak dapat mempertahankan kualitas spermatozoa sebaik kuning telur pada P0, tetapi P2 menunjukkan kemampuan terbaik dari berbagai konsentrasi santan dalam menjaga kualitas spermatozoa dan total spermatozoa yang motil.

ABSTRACT

*This research was carried out at Laboratory of Balai Besar Inseminasi Buatan, Singosari, Malang start from 8th May until 27th May 2014. Research was to find the effect of liquid semen of Limousin during chilled preservation. Semen divided into four with 5%, 10%, 15%, coconut milk (P1=CEP-2+5% S, P2=CEP-2+10% S, P3=CEP-2+15% S) and 10% egg yolk (P0=CEP-2+10% KT), gave the best result in P0 and has highly significant different ($P<0,01$) than others treatments, listed from higher to the lower from P2, P1, and P3 then motility after 24h were analysis with *Pearson's Chi-Square* and used to compare total motile sperm count with expected value 40 million cells/mL showed that egg Yolk gave the superior effect on sperm quality after 24h preservation. The motiity, viability, and abnormalitas in CEP-2+ Coconut Milk has highly significant different ($P<0,01$) lower compared to CEP-2+ 10% KT. The various level extender of coconut Milk in CEP-2 can't maintain the sperm quality as well as egg yolk, but P2 had shown best ability of maintain sperm quality and total motile sperm*

Key Words : Semen, extender, preservation, coconut Milk, and egg yolk

PENDAHULUAN

Semakin bertambahnya jumlah penduduk di Indonesia dengan kesadaran masyarakat akan konsumsi protein hewani, menyebabkan tingginya permintaan daging nasional. Hal tersebut belum diimbangi dengan produktifitas sapi yang berakibat pada impor daging beku yang semakin tinggi. Upaya untuk mengatasi permasalahan tersebut dalam meningkatkan produktifitas sapi yaitu dengan memanfaatkan teknologi Inseminasi Buatan (IB) (Alawiyah dan Hartono, 2006). Salah satu faktor keberhasilan IB yaitu kualitas semen yang digunakan. Menjaga kualitas semen saat pendinginan atau pembekuan dapat dilakukan dengan menggunakan bahan pengencer yang dapat memberikan nutrisi secara optimum sebagai sumber energi, mencegah *cold shock* saat preservasi maupun kriopreservasi dan dapat menjaga pH dan tekanan osmotik bagi spermatozoa (Ihsan, 2011; Suharyati dan Hartono, 2011). Salah satu pengencer yang dapat digunakan pada suhu rendah yaitu *Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) yang telah dikembangkan oleh Verberckmous, Soom, Dewulf, Pauw, dan Kruif (2004) yang komposisinya mirip dengan cairan kauda epididimis sapi. Kerusakan spermatozoa menjadi kendala dalam upaya mempertahankan semen pada suhu rendah. Upaya yang dapat dilakukan untuk mencegah hal tersebut yaitu dengan memberikan penambahan senyawa krioprotektan, pada umumnya krioprotektan yang dipakai untuk proses preservasi yaitu krioprotektan ekstraseluler kuning telur. Penggunaan kuning telur beresiko dalam kontaminasi mikroba patogen. Cemarannya dapat terjadi saat proses pengenceran semen berlangsung. Nugroho (2006) menyatakan bahwa prevalensi cemaran *Salmonella sp.* pada peternakan sebesar 11,4% dan pada telur sebesar 1,4%. Alternatifnya yaitu dengan penambahan santan. Santan pernah diaplikasikan dalam preservasi spermatozoa sapi (Vishwanath dan

Shannon., 2000). Santan mengandung fosfolipid (Oktarini, 2005). Susilawati (2002) menambahkan senyawa lipoprotein yang memiliki makromolekul yang besar tidak dapat menembus membran spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein penyusun membran spermatozoa.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi santan pada pengencer dasar CEP-2 terhadap kualitas semen Sapi Limousin selama pendinginan pada suhu rendah

MATERI DAN METODE

Penelitian dimulai 8 Mei 2014 sampai dengan 27 Mei 2014, dilakukan di Laboratorium Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Kabupaten Malang. Materi penelitian yang digunakan yaitu semen Sapi Limousin dari BBIB Singosari Malang, berumur 6-11 tahun yang dikoleksi setiap seminggu dua kali menggunakan vagina buatan. Semen segar dikoleksi dengan bantuan vagina buatan, selanjutnya dilakukan uji makroskopis yang meliputi volume, warna, bau, dan pH, sedangkan uji mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi. Santan didapatkan dari kelapa yang berasal dari Sekolah Tinggi Penyuluhan Pertanian (STTP) Singosari Malang, dilarutkan dengan aquadest. Rasio santan dengan pelarut aquadest sebesar 1:1. Berbagai konsentrasi santan yang digunakan yaitu 5%; 10%; dan 15%. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa ++ dan motilitas individu $\geq 55\%$, dengan frekuensi penampungan semen dua kali dalam seminggu yakni pada hari Senin dan Kamis. Kuning telur yang digunakan adalah kuning telur (KT) *fresh* yang berasal dari ayam ras petelur (*layer*) berumur <4 hari yang diperoleh

dari peternak ayam petelur di Dusun Manggisari, Kecamatan Karangploso, Kabupaten Malang. Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 perlakuan yaitu $P_0 = \text{CEP-2} + 10\% \text{ KT}$; $P_1 = \text{CEP-2} + 5\% \text{ Santan}$; $P_2 = \text{CEP-2} + 10\% \text{ Santan}$; $P_3 = \text{CEP-2} + 15\% \text{ Santan}$ dengan 10 ulangan. Variabel yang diukur yaitu makroskopis: pH, warna, bau, konsistensi, volume, dan mikroskopis: motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi spermatozoa, kemudian data yang diperoleh selanjutnya diuji dengan Uji Jarak Berganda Duncan. Perlakuan pengencer terbaik antara CEP-2 Kuning Telur dan CEP-2 Santan kemudian diuji menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40%. Total spermatozoa motil dihitung dengan nilai harapan 40 juta/ml sesuai dengan SNI.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Semen Segar

Semen segar setelah ditampung dilakukan pemeriksaan kualitas secara makroskopis yang meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH. Pemeriksaan secara

mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, viabilitas, abnormalitas, dan konsentrasi. Hasil rata-rata pemeriksaan semen segar Sapi Limousin dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil evaluasi volume semen segar dalam penelitian ini berkisar antara 5,4-8 ml dengan rata-rata $6,72 \pm 1,14$. Semen segar menunjukkan warna putih susu dengan pH $6,4 \pm 0,14$ dan konsistensi sedang. Warna dan pH semen segar yang diperoleh termasuk dalam kategori normal. Rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4-7,8 dengan warna putih kekuningan (Garner dan Hafez, 2008). Variasi warna semen sapi dimulai dari warna putih kekuningan sampai hampir menyerupai warna susu, hal ini disebabkan karena adanya riboflavin pada semen (Susilawati, 2011). Konsistensi semen segar dalam kategori sedang. Konsistensi berkolerasi dengan banyaknya spermatozoa yang ada pada semen, konsistensi dapat dikatakan sedang bila konsentrasi $1000 \cdot 10^6 - 1500 \cdot 10^6$ spermatozoa/ml semen (Susilawati, 2011).

Tabel 1. Hasil Rataan Pemeriksaan Semen Segar Sapi Limousin

Variabel (n=5)	Rataan \pm SD
Kondisi Umum	
Umur (tahun)	$7,6 \pm 2,30$
BB(kg)	$986 \pm 113,46$
Makroskopis	
Volume (ml)	$6,72 \pm 1,14$
Warna	Putih Susu
pH	$6,4 \pm 0,14$
Konsistensi	Sedang
Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	$57 \pm 2,74$
Viabilitas (%)	$80,13 \pm 0,36$
Abnormalitas (%)	$10,71 \pm 2,09$
Konsentrasi (10^6 /ml)	$1152 \pm 407,38$

Hasil pemeriksaan secara mikroskopis menunjukkan motilitas massa ++, sedangkan motilitas individu menunjukkan rata-rata $57 \pm 2,74\%$ dengan viabilitas $80,13 \pm 0,36\%$ dan abnormalitas sebesar $10,71 \pm 2,09\%$. Kualitas semen segar yang diperoleh sudah memenuhi Standar Nasional Indonesia (SNI) untuk IB yaitu motilitas massa minimal 2+ dan abnormalitas kurang dari 20% (Hafez, 2000) dengan viabilitas $\geq 70\%$ yang dapat dikategorikan masih baik, karena memiliki kisaran persentase antara 50-69% (Lopes, 2002). Rataan konsentrasi semen segar yang didapat yaitu $1152 \pm 407,38$. Konsentrasi tersebut sudah sesuai dengan standar yaitu berjumlah ≥ 1000 juta/ml (Susilawati, 2000). Hasil evaluasi semen segar yang telah diperoleh menunjukkan bahwa kualitas semen segar dapat dipakai sebagai bahan penelitian semen cair.

Persentase Motilitas Spermatozoa selama Pendinginan

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa keempat perlakuan berpengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap motilitas spermatozoa baik pada saat awal penyimpanan suhu dingin sampai pada jam ke 24 (Tabel 2). P₀ (CEP-2+10% KT) merupakan perlakuan dengan motilitas paling baik, disusul dengan P₂ (CEP-2+10% Santan), lalu P₁ (CEP-2+5% Santan) dan P₃ (CEP-2+15% Santan). Motilitas pada P₁, P₂ dan P₃ berada di bawah standar SNI namun masih dapat digunakan untuk IB, sesuai dengan Susilawati (2011) yang melaporkan bahwa semen dengan PTM 20-30%, 30-40%, dan $\geq 40\%$ menunjukkan tingkat kebuntingan yang tinggi antara 90-100%. BSA dan kuning telur yang terkandung di dalam CEP-2 mempunyai peran sebagai pelindung dan pertahanan permeabilitas dan integritas lipoprotein yang menyusun membran spermatozoa (Yamashiro *et al.*, 2006; Susilawati, 2002).

Tabel 2. Rataan \pm SD Persentase Motilitas pada Berbagai Perlakuan Pengencer Selama Proses Pendinginan (%)

Perlakuan	Jam ke 0	Jam ke 1	Jam ke 2	Jam ke 3	Jam ke 24
P3	$54 \pm 2,69^b$	$51 \pm 1,75^b$	$47,5 \pm 4,25^b$	$43 \pm 1,97^b$	$28 \pm 1,58^c$
P1	$54,25 \pm 2,9^b$	$51,75 \pm 2,9^b$	$48,5 \pm 4,12^b$	$43,5 \pm 2,69^b$	$29 \pm 1,75^c$
P2	$55,75 \pm 1,21^a$	$55 \pm 1,67^a$	$53 \pm 1,58^a$	$48 \pm 3,07^a$	$36,25 \pm 2,43^b$
P0	$56 \pm 1,29^a$	$55,5 \pm 1,97^a$	$53,75 \pm 1,32^a$	$50,25 \pm 2,75^a$	$42 \pm 3,07^a$
Taraf Nyata	**	**	**	**	**

Keterangan :

*: Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).

** : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$)

Hasil uji *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan persentase motilitas sebesar 40% menunjukkan terdapat

perbedaan antara P₀ dan P₂ dalam mempertahankan motilitas spermatozoa selama 24 jam penyimpanan suhu dingin.

Persentase Viabilitas Spermatozoa selama Pendinginan

Perlakuan P₀ (Tabel 3) menunjukkan nilai viabilitas tertinggi daripada perlakuan yang lain, baik pada jam ke 0,1,2,3, maupun 24, terjadi perbedaan sangat nyata (P<0,01) jika dibandingkan dengan perlakuan menggunakan pengencer santan. Pada saat jam ke 24 terjadi penurunan nilai viabilitas yang tajam pada perlakuan dengan menggunakan berbagai konsentrasi santan, perlakuan dengan menggunakan kuning telur memberikan nilai yang terbaik yaitu

70,09± 0,78%. Ketengikan yang diakibatkan karena tingginya kadar lemak akan mempengaruhi kestabilan pH dan menyebabkan cepatnya kematian sperma yang berimbas pada rendahnya nilai viabilitas santan (Solihati, 2008), sedangkan kuning telur yang ditambahkan pada pengencer CEP-2 memiliki kandungan lesitin dan lipoprotein dengan molekul- molekul besar sehingga membran sel tidak dapat ditembus dan dapat melindungi integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002).

Tabel 3. Rataan ±SD Persentase Viabilitas pada Berbagai Perlakuan Pengencer Selama Proses Pendinginan (%).

Perlakuan	Jam ke 0	Jam ke 1	Jam ke 2	Jam ke 3	Jam ke 24
P3	74,37± 0,42 ^d	73,49± 0,55 ^d	72,38± 1,10 ^c	72,06± 1,09 ^c	47,63± 2,41 ^d
P1	75,45± 0,38 ^c	74,25± 0,55 ^c	73,87± 0,61 ^b	73,5± 0,85 ^b	54,49± 2,54 ^c
P2	77,41± 0,66 ^b	75,56± 0,49 ^b	75,41± 0,74 ^a	75,02± 0,39 ^a	60,07± 0,79 ^b
P0	78,14± 0,40 ^a	76,52± 0,52 ^a	76,18± 0,55 ^a	75,91± 0,73 ^a	70,09± 0,78 ^a
Taraf nyata	**	**	**	**	**

Keterangan:

** : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Persentase Abnormalitas Spermatozoa selama Pendinginan

Nilai abnormalitas terbaik ada pada P₀ dengan analisis ragam menunjukkan bahwa keempat perlakuan berbeda sangat

nyata (P<0,01). Namun, pada jam ke 24 semua perlakuan menunjukkan nilai abnormalitas di bawah 20% (Tabel 4), maka semen masih dapat digunakan untuk IB (Alawiyah dan Hartono, 2006).

Tabel 4. Rataan ±SD Persentase Abnormalitas pada Berbagai Perlakuan Pengencer Selama Proses Pendinginan (%).

Perlakuan	Jam ke 0	Jam ke 1	Jam ke 2	Jam ke 3	Jam ke 24
P3	13,97± 0,34 ^b	14,06± 0,81 ^c	14,72± 0,97 ^b	15,02± 0,38 ^b	17,63± 1,02 ^b
P1	13,38± 0,71 ^b	13,26± 0,70 ^b	14,07± 1,04 ^b	14,56± 0,82 ^b	17,24± 1,02 ^{ab}
P2	12,5± 0,95 ^{ab}	12,88± 0,59 ^a	13,14± 0,98 ^a	13,9± 0,58 ^a	17,01± 0,70 ^{ab}
P0	12,14± 0,90 ^a	12,38± 1,10 ^a	12,76± 1,22 ^a	13,31± 0,66 ^a	16,59± 0,76 ^a
Taraf nyata	**	**	**	**	**

Keterangan :

* : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

** : Notasi yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01)

Rusaknya membran plasma spermatozoa karena membran spermatozoa banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang rentan terhadap kerusakan peroksidase. Hal ini sering terjadi saat preservasi semen (Maxwell dan Wakson., 1996 dalam Fitria dkk.,2013). Selain itu kerusakan juga dapat diakibatkan saat pembuatan ulasan pada *object glass*, sehingga abnormalitas yang terbentuk yaitu sperma dengan ekor yang patah atau kepala tanpa ekor.

Pada pengencer CEP-2+10% KT memiliki nilai abnormalitas paling rendah karena pengencer tersebut dapat meminimalisir abnormalitas spermatozoa, adanya lesitin dan kuning telur yang berfungsi sebagai pelindung dalam

mempertahankan integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa (Susilawati, 2002).

Total Spermatozoa Motil pada Pendinginan Selama 24 Jam

Efektivitas fertilitas tergantung pada kualitas semen, yang dinilai dari jumlah spermatozoa yang motil. Jumlah spermatozoa motil dapat dihitung dengan mengalikan konsentrasi spermatozoa dengan spermatozoa yang motil progresif (Nikbakht and Saharkhiz, 2011).). Rataan hasil penghitungan total spermatozoa yang motil pada berbagai perlakuan pada penyimpanan suhu dingin jam ke 24 tertera pada Tabel 5.

Tabel 5. Total Spermatozoa Motil pada Pendinginan Jam ke 24

Perlakuan	Total Spermatozoa Motil (juta/ml)	SD
P0	81,36	18,35
P1	58,28	14,36
P2	67,79	16,32
P3	53,29	10,67
Nilai Harapan	40,00	

Penambahan kuning telur dalam pengencer CEP-2 lebih baik dalam mempertahankan spermatozoa yang motil dibandingkan dengan perlakuan dengan penambahan santan. Penambahan berbagai konsentrasi santan pada pengencer CEP-2 menunjukkan hasil yang lebih besar dari standar yang telah ditetapkan oleh SNI yaitu 40 juta/ml spermatozoa yang motil, sehingga dapat diaplikasikan untuk IB. Hasil analisis menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40 juta spermatozoa motil menunjukkan perbedaan sangat nyata pada semua

perlakuan selama pendinginan jam ke 24 ($P < 0,01$). Konsentrasi santan pada P2(CEP-2+ 10% Santan) merupakan konsentrasi yang optimal dalam mempertahankan total spermatozoa motil.

KESIMPULAN DAN SARAN

Pengencer CEP-2 dengan penambahan kuning telur 10% (P₀) lebih baik dari pengencer CEP-2+ santan 5% (P₁) dan CEP-2+ santan 10% (P₂), perlakuan yang memiliki kualitas penyimpanan spermatozoa paling rendah yaitu CEP-2+ santan 15% (P₃)rendahnya

nilai NRR dapat memberikan implikasi rendahnya keberhasilan IB. Saran untuk penelitian ini, Perlu adanya penelitian lebih lanjut dengan penambahan lama waktu simpan sampai motilitas menunjukkan tidak ada pergerakan sama sekali (0%) untuk mengetahui lamanya kemampuan pengencer CEP-2 dengan penambahan kuning telur dan santan dalam mempertahankan kualitas spermatozoa.

DAFTAR PUSTAKA

- Alawiyah, D., dan M. Hartono. 2006. Pengaruh penambahan vitamin E dalam bahan pengencer sitrat kuning telur terhadap kualitas semen beku kambing boer. *J.Indon.Trop.Anim.Agric.* 31 (1): 8-14.
- Fitria, R., T. Susilawati, dan S. Rahayu. 2013. Kualitas spermatozoa hasil sexing menggunakan pengencer andromed dan Cauda Epididymal Plasma-2 (CEP-2) ditambah kuning telur 10%. 7(2) : 116-119.
- Garner, D. L., and E. S. E. Hafez. 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma in Reproduction in Farm Animals*. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia : 96-110.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Artificial Insemination In Reproduction In Farm Animals*. Hafez ESE and B Hafez (editors) 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Marryland, USA: 82-95.
- Ihsan, M. N. 2011. Penggunaan telur itik sebagai pengencer semen kambing. *J.Ternak Tropika*. 12(1) : 10-14.
- Lopes, P. 2002. Semen Collection and evaluation in Ram. ANS 33161. University of Florida.
- Nikbakht, R. And N. Saharkhiz. The Influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm samples on the success of intrauterine insemination. *International Journal of Fertility and Sterility*. Vol. 5 (3): 168-173.
- Nugroho, W.S. 2006. Tingkat cemaran *Salmonella sp.* pada telur ayam di peternakan ayam petelur komersial kabupaten Sleman, Yogyakarta. *Jurnal Veteriner FKH UNUD* 7(2): 160 -165.
- Oktarini, D. 2005. Identifikasi Kandungan Fosfolipid Santan Kelapa yang Diperoleh Melalui Metode *Degumming*. Skripsi Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Diponegoro. Semarang. 2005.
- Solihati, N. 2008. Studi terhadap kualitas dan daya tahan hidup spermatozoa cauda epididimis domba Garut menggunakan berbagai jenis pengencer. Seminar nasional teknologi peternakan dan veteriner 2008.
- Suharyati, S., dan M. Hartono. 2011. Preservasi dan kriopreservasi semen sapi Limousin dalam berbagai bahan pengencer. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 5(2): 53-58.
- Susilawati, T. 2000. Analisa Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex G-200 dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Susilawati, T. 2002. Sexing spermatozoa kambing peranakan etawah menggunakan gradien putih telur. *Widya Agrika* 10(2): 97-105.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang.
- Verberckmoes, S., A. Van Soom, J. Dewulf., I. De Pauw, and A. de Kruif. 2004. Storage of fresh bovine semen in diluent based on the ionic composition of *Cauda*

- Epydidimal Plasma*. J Reprod Domestic Anim. 39(6): 1 – 7.
- Vishwanath, R., And P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen State. Animal Reproduction Science 62(2000) 23-53.
- Yamashiro, H., H. Wang, Y. Yamashita, K. Kumamoto, and T. Terada. 2006. Enhanced freezability of got spermatozoa collected Tinto tube containing extender suplementer Alt bovine serum albumin (BSA). Journal of Reproduction and Development 52(3): 407- 414.