

KUALITAS SPERMATOZOA *SWIM UP* KAMBING PERANAKAN ETAWAH HASIL PEMBEKUAN MENGGUNAKAN METODE VITRIFIKASI DENGAN PERSENTASE GLISEROL YANG BERBEDA

Saka Wahyu Hikmawan¹⁾, Gatot Ciptadi²⁾ dan Sri Wahyuningsih²⁾

1) Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

2) Dosen Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya

sakawahyu32@yahoo.com

ABSTRACT

The objective of this research was to examine the effect of glycerol addition in different percentage to quality of *swim up* spermatozoa from Etawah Grade buck that frozen with vitrification method. This research was carried out at Frozen Semen Laboratory, Sumbersekar, Faculty of Animal Husbandry, Brawijaya University from February 2016 to March 2016. This research design was experimental laboratory using completely randomized design and the data were analyzed using Analysis of Variance (ANOVA) one way pattern, followed by the multiple test Duncan. There were four treatments in this research (P0= Tris-Yolk + 0% Glycerol, P1= Tris-Yolk + 7% Glycerol, P2= Tris-Yolk + 14% Glycerol, P3= Tris-Yolk + 21% Glycerol). Each treatment consisted of ten replications. The results showed that addition of glycerol was significantly different ($P < 0,01$) on the percentage of post thawing motility, viability, and total spermatozoa motility. It was concluded that addition of glycerol 7% gave the best result on spermatozoa quality.

Keywords : *swim up*, glycerol, frozen semen, vitrification, post thawing motility

PENDAHULUAN

Inseminasi buatan (IB) merupakan salah satu teknologi alternatif yang saat ini banyak digunakan untuk meningkatkan produktivitas dan populasi ternak. Selain itu IB dapat mengoptimalkan penggunaan semen pejantan yang memiliki potensi genetik unggul, sehingga seekor pejantan unggul dapat digunakan untuk mengawini banyak betina. Salah satu hal yang sangat mempengaruhi keberhasilan IB adalah kualitas semen. Semen yang tidak segera digunakan pasca penampungan akan mengalami penurunan kualitas. Kualitas semen dapat dipertahankan pada saat penyimpanan dan pembekuan dengan cara penambahan bahan pengencer yang dapat mendukung kelangsungan hidup spermatozoa. Pengencer yang baik mampu mempertahankan kualitas semen.

Upaya mempertahankan kualitas semen dapat dilakukan melalui penggunaan bahan pengencer yang baik dan mampu mempertahankan kualitas semen. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk mempertahankan kualitas semen dengan menggunakan cara *swim up* dalam medium

yang isotonis. Tujuan dari *swim up* spermatozoa adalah untuk mendapatkan spermatozoa dengan motilitas yang terbaik, sehingga diperoleh semen kualitas baik sebelum diproses ke tahapan selanjutnya. Faktor lain seperti penyimpanan semen juga ikut mempengaruhi keberlangsungan daya hidup spermatozoa.

Berbagai cara telah dikembangkan untuk mengatasi masalah penyimpanan semen yang digunakan untuk inseminasi buatan, sehingga semen dapat digunakan tanpa dibatasi kendala jarak dan waktu. Salah satunya dengan produksi semen beku dengan teknik kriopreservasi semen, yaitu suatu cara untuk menyimpan semen dalam bentuk beku yang bertujuan untuk menyimpan, pemeliharaan, menjamin dan mempertahankan kelangsungan hidup spermatozoa. Metode kriopreservasi yang semakin banyak digunakan yaitu metode vitrifikasi atau *rapid freezing* (Endo, Fujii, Shintani, Seo, Motoyama dan Funahashi, 2012).

Vitrifikasi merupakan metode kriopreservasi yang semakin populer dalam

bidang reproduksi untuk memecahkan berbagai masalah biologis baik dasar maupun terapan melalui proses kriopreservasi yang lebih sederhana daripada metode pembekuan konvensional. (Pamungkas, 2010). Prinsip dari metode vitrifikasi adalah pembekuan sel menggunakan konsentrasi krioprotektan yang tinggi pada laju penurunan suhu (*cooling rate*) dan laju peningkatan suhu (*warming rate*) yang cepat tetapi masih dalam batas tertentu untuk meminimalkan potensi toksisitas terhadap sel (Elder and Dale, 2011).

Salah satu hal yang terpenting dalam pembekuan semen adalah bahan yang digunakan sebagai krioprotektan. Terdapat dua kelompok krioprotektan yang apabila dilihat dari sifat fisika kimia dan membran selnya yaitu krioprotektan intraseluler dan ekstraseluler. Krioprotektan intraseluler ialah bahan pelindung yang bersifat *permeable* sehingga dapat menembus membran sel karena ukuran molekulnya yang kecil, contohnya adalah *ethylene glycol* (EG), *1,2-propanediol* (PROH), *dimethylsulfoxide* (DMSO) dan gliserol (Elder and Dale, 2011). Krioprotektan ekstraseluler bersifat *non-permeable* sehingga tidak berdifusi ke dalam sel, contohnya adalah *glycine*, *zwitterions*, *citrate*, dan kuning telur (Gardner, Weissman, Howles, and Shoham, 2009).

Penambahan krioprotektan di dalam media pengencer seperti gliserol merupakan salah satu alternatif untuk mengatasi rendahnya kualitas semen beku kambing akibat *cold shock*. Hal ini diperkuat dengan pendapat Ariantie, Yusuf, Sajuthi, dan Arifiantini (2013) yang menyatakan bahwa penambahan krioprotektan dalam pengencer dapat melindungi spermatozoa dari efek mematikan dan mencegah terbentuknya kristal es intraseluler. Maka dari itu, diperlukan penelitian mengenai uji kualitas semen kambing Peranakan Etawah yang dibekukan dengan metode vitrifikasi dengan persentase gliserol yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Semen Beku Sumber Sekar Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya pada bulan Februari sampai dengan Maret 2016.

Materi yang digunakan berupa semen segar yang berasal dari 10 kali penampungan

dari seekor pejantan kambing lokal PE berumur 2,5 tahun. Kambing ditampung dua kali dalam seminggu dengan menggunakan metode vagina buatan. Semen segar yang digunakan dalam penelitian ini memiliki motilitas massa minimal 2+ dan motilitas individu $\geq 70\%$. Pengencer yang digunakan adalah pengencer *Trisaminomethane* kuning telur (TKT) yang didapatkan dari BBIB Singosari Malang.

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 10 kali ulangan, yaitu P0 = TKT + 0% Gliserol, P1 = TKT + 7% Gliserol, P2 = TKT + 14% Gliserol, P3 = TKT + 21% Gliserol. Prosedur yang pertama kali dilakukan adalah uji kualitas semen segar, setelah itu spermatozoa diseleksi dengan menggunakan metode *swim up*, lalu dilakukan pengenceran dengan 4 perlakuan, kemudian dilakukan pembekuan menggunakan metode vitrifikasi dan hasilnya diuji kualitas spermatozoa pasca *thawing*.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA). Selanjutnya, apabila terdapat perbedaan yang nyata atau sangat nyata, maka dilakukan pengujian selanjutnya menggunakan uji Jarak Berganda Duncan (JBD). Data Total Spermatozoa Motil dianalisa menggunakan Uji Chi square untuk membandingkan antara nilai yang diobservasi dengan nilai harapan yang telah ditetapkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Semen Segar Kambing Peranakan Etawah

Rata-rata kualitas semen segar kambing PE yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata kualitas semen segarkambing PE dari sepuluh kali penampungan

Parameter	Rata-rata ± SD
Kualitas Makroskopis	
Bau/Aroma	Khas semen
Volume/ejakulat (ml)	0,86 ± 0,33
Warna	Putih kekuningan
pH	7,00 ± 0,00
Konsistensi	Sedang
Kualitas Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Persentase Motilitas Individu (%)	73,00 ± 4,21
Persentase Viabilitas (%)	93,01 ± 6,07
Persentase Abnormalitas (%)	3,67 ± 1,41
Konsentrasi (juta/ml)	2642,5 ± 993,59

Rata-rata hasil evaluasi volume semen segar kambing yang digunakan dalam penelitian ini tergolong normal sesuai standar yaitu sebesar 0,86 ± 0,33 ml. Volume tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Ariantie, Yusuf, Sajuthi dan Arifiantini (2014) yang memiliki volume semen segar kambing PE rata-rata sebesar 1,14 ± 0,14 ml. Perbedaan volume ejakulat disebabkan berbagai macam faktor. Ax, Dally, Didion, Lenz, Love, Varner, Hafez and Bellin (2008) menyatakan bahwa volume ejakulat pada ternak berbeda-beda karena dipengaruhi berbagai faktor diantaranya faktor usia ternak, frekuensi penampungan, dan perbedaan bangsa ternak.

Semen yang digunakan dalam penelitian ini memiliki warna yang dikategorikan normal yaitu putih kekuningan. Warna semen bervariasi tergantung dari individu ternak serta faktor lain yang mempengaruhi. Susilawati (2013) menyatakan bahwa semen kambing berwarna abu-abu hingga kekuningan dan diantara pejantan warna bervariasi juga pada pejantan yang sama. Semen normal berwarna putih kekuningan atau putih susu.

Semen segar dari kambing PE yang digunakan dalam penelitian ini memiliki pH sebesar 7,0. Nilai tersebut menunjukkan bahwa pH semen kambing yang digunakan

adalah normal, sesuai dengan pendapat Hafez (2008) yang menyatakan bahwa pH semen kambing berkisar antara 6,2 – 7,0.

Rataan motilitas massa dari hasil penelitian ini yaitu ++, sedangkan motilitas individu memiliki rata-rata 73,00 ± 4,21 %. Ducha, Susilawati, Aulanni'am, dan Wahyuningsih (2013) menyatakan bahwa persyaratan motilitas massa dan motilitas individu yang sesuai dengan SNI (Standar Nasional Indonesia) adalah minimal ++ untuk motilitas massa dan 70% untuk motilitas individu.

Rata-rata persentase viabilitas spermatozoa kambing PE yang digunakan yaitu 93,01 ± 6,07 %. Sedangkan rata-rata persentase abnormalitas sebesar 3,67 ± 1,41 %. Hal tersebut menunjukkan bahwa semen kambing yang digunakan dapat dikategorikan layak, sesuai dengan pendapat Ducha dkk., (2013) yang menyatakan bahwa syarat semen segar yang akan dibekukan yaitu memiliki persentase spermatozoa yang hidup minimal 70%.

Persentase Motilitas Spermatozoa *Post Thawing*

Rata-rata dan simpangan baku persentase motilitas spermatozoa *post thawing* pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Rata-rata motilitas spermatozoa *post thawing* pada masing-masing perlakuan.

Perlakuan	Rata-rata Motilitas semen ± SD (%)
P0	10,25 ± 3,81 ^a
P1	30,75 ± 9,06 ^d
P2	29,25 ± 8,34 ^c
P3	22,50 ± 7,07 ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata (P<0,01).

Berdasarkan hasil analisa ragam persentase motilitas *post thawing* pada berbagai perlakuan dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata (P<0,01) antar perlakuan P0, P1, P2, dan P3. Motilitas *post thawing* pada perlakuan P0 menunjukkan nilai terendah dari perlakuan yang lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa P0 tidak dapat mempertahankan motilitas spermatozoa dengan baik pada saat pembekuan. Tanpa

penambahan gliserol spermatozoa tidak akan bertahan dalam jangka waktu yang lama saat pembekuan, bahkan akan merusak sel spermatozoa secara cepat. Qureshi *et.al.*,(2013) menyatakan bahwa semen kambing yang dibekukan rentan terhadap kerusakan seluler secara ultrastruktur, biokimia, fungsional akibat terbentuknya kristal es. Hal ini menyebabkan meingkatnya jumlah kematian spermatozoa. Ciptadi (2012) menambahkan bahwa penambahan bahan krioprotektan ke dalam medium atau pengencer sangat diperlukan untuk mempertahankan daya hidup spermatozoa.

Gliserol sebagai agen krioprotektan intraseluler sangat berperan dalam mencegah terjadinya *cold shock* saat proses pembekuan. Susilawati (2013) menyatakan bahwa peranan gliserol sebagai bahan krioprotektan dalam alur mekanisme reaksi preservasi sel adalah sebagai penurunan titik beku medium krioprotektan, perlindungan terhadap membran sel, menekan laju pengaruh peningkatan konsentrasi, serta merubah bentuk dan ukuran kristal es.

Motilitas *post thawing* terbaik terdapat pada perlakuan P1 yang mengandung gliserol sebanyak 7%, yaitu sebesar $30,75 \pm 9,06$ % . Rataan motilitas pada P1 tidak berbeda jauh dengan rataan motilitas pada P2 yang mengandung gliserol sebanyak 14%, yaitu sebesar $29,25 \pm 8,34$ % . Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi gliserol yang digunakan dalam keadaan optimal, artinya tidak berlebih maupun kurang, sebagaimana hasil penelitian Kulaksiz *et.al.*, (2013), yang menyatakan bahwa penggunaan gliserol 5% - 7% memberikan hasil terbaik pada pembekuan semen kambing.

Pada penambahan gliserol dengan konsentrasi 21% (P3) memiliki hasil yang lebih rendah dari P1 dan P2 yaitu sebesar $22,50 \pm 7,07$ % .Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi gliserol yang tinggi ternyata tidak dapat mempertahankan motilitas spermatozoa dan justru menurunkan kualitas spermatozoa. Menurut Azizah dan Arifiantini (2009), konsentrasi gliserol yang tinggi dapat menimbulkan efek toksik bagi spermatozoa dan kemungkinan lain adalah tekanan osmotik yang tinggi sehingga air dari dalam sel akan tertarik keluar sehingga menyebabkan dehidrasi.

Persentase Viabilitas Spermatozoa *Post Thawing*

Rata-rata dan simpangan baku persentase viabilitas spermatozoa pasca pembekuan pada berbagai perlakuan dapat dilihat Tabel 3.

Tabel 3. Rata-rata Persentase Viabilitas spermatozoa *post thawing* pada berbagai perlakuan.

Perlakuan	Persentase viabilitas <i>Post thawing</i> (%)
P0	$25,09 \pm 6,91^a$
P1	$43,81 \pm 5,86^d$
P2	$40,40 \pm 7,09^c$
P3	$35,08 \pm 6,71^b$

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$).

Hasil analisa ragam persentase viabilitas spermatozoa pasca pembekuan (Lampiran 2) menunjukkan bahwa terdapat adanya perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan P0, P1, P2, dan P3. Berdasarkan uji lanjutan beda rata-rata Duncan (Lampiran 2) diketahui bahwa terdapat perbedaan rata-rata yang signifikan antara P0 dengan P1, P2, dan P3. Nilai viabilitas terendah dimiliki oleh P0 sebesar $25,09 \pm 6,91$ % . Angka tersebut masih lebih tinggi apabila dibandingkan dengan hasil penelitian Kulaksiz *et al.*, (2013) yang menyebutkan bahwa persentase viabilitas kambing Saanen pasca pembekuan sebesar $10,6 \pm 0,88$ % .

Rendahnya nilai viabilitas P0 berarti tidak adanya perlindungan yang optimal kepada spermatozoa, sehingga menyebabkan banyak spermatozoa yang mati karena membran kepala yang telah rusak akibat *cold shock* selama proses pembekuan. Menurut Elder *and* Dale (2011), selama proses pembekuan, sel spermatozoa memiliki kecenderungan mengalami stres seluler yang disebabkan karena pengaruh langsung akibat penurunan suhu secara drastis dan perubahan secara fisik akibat terbentuknya kristal es, sehingga tanpa adanya pelindung sel spermatozoa mudah mengalami kematian. Selain itu, Ariantie dkk., (2014) menyatakan bahwa rendahnya kualitas spermatozoa kambing diduga akibat keberadaan enzim *phospholipase A* yang disebut yang ada di dalam *bulbourethral gland*

secretion (BUS) yang dapat menghidrolisis fosfolipid kuning telur dalam medium pengencer, sehingga kuning telur kehilangan daya kripreservasinya yang menyebabkan kematian spermatozoa.

Persentase viabilitas terbaik ditunjukkan pada perlakuan P1 yaitu sebesar $43,81 \pm 5,86$ %. Hal tersebut menandakan tingkat gliserol 7% memberikan perlindungan yang optimal dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa. Nilai tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian Setiono dkk., (2015) yang menunjukkan persentase viabilitas semen sapi Brahman pasca pembekuan pada level gliserol 7% sebesar $50,32 \pm 8,06$ %.

Penambahan konsentrasi gliserol sebesar 21% (P3), tidak memberikan hasil yang lebih baik dari penambahan gliserol 7%. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi gliserol yang terlalu tinggi juga tidak dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa. Sebagaimana yang dijelaskan oleh Setiono dkk., (2015), dosis gliserol yang tinggi menimbulkan efek negatif bagi spermatozoa diantaranya menghambat metabolisme energi dan meningkatnya tekanan osmotik pada pengencer seiring bertambahnya dosis gliserol. Selain itu, Mumu (2009) menyatakan bahwa tinggi rendahnya konsentrasi gliserol terhadap konsentrasi optimal akan mengakibatkan tekanan osmotik pengencer berubah ke arah hipertonic.

Tingkat Penurunan Abnormalitas Spermatozoa Post Thawing

Tingkat penurunan persentase abnormalitas pascapembekuan pada berbagai perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram yang menunjukkan pengaruh penambahan gliserol terhadap tingkat penurunan persentase abnormalitas.

Keterangan :S1 = P0 - P1 (Selisih antara P0 dan P1); S2 = P0 - P2 (Selisih antara P0 dan P2); S3 = P0 - P3 (Selisih antara P0 dan P3).

Penambahan gliserol dengan persentase yang berbeda berpengaruh terhadap penurunan persentase abnormalitas spermatozoa, apabila dilihat dari selisih rataan persentase abnormalitas antar perlakuan. Perlakuan tanpa penambahan gliserol memiliki persentase abnormalitas yang paling tinggi. Diagram di atas menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi gliserol yang digunakan maka tingkat penurunan abnormalitas semakin rendah, yang berarti persentase abnormalitas meningkat.

Penambahan gliserol sebesar 7% (P1) menghasilkan tingkat penurunan persentase abnormalitas yang paling tinggi dibandingkan dengan penggunaan gliserol 14% dan 21%. Hal tersebut berarti bahwa penambahan gliserol 7% sudah dapat melindungi spermatozoa secara optimal. Hasil yang berbeda dijumpai pada penelitian Kulaksiz *et al.*,(2013) yang menyatakan bahwa penambahan gliserol sebesar 5% menghasilkan persentase abnormalitas paling rendah pada pembekuan semen Angora, Kilis, dan Saanen.

Perbedaan ini diduga disebabkan karena pengaruh perlakuan penambahan gliserol dengan konsentrasi yang berbeda. Mumu (2009) menjelaskan bahwa gliserol akan memberikan perlindungan yang efektif apabila konsentrasinya di dalam pengencer optimal. Apabila tidak optimal maka dapat menyebabkan penurunan kualitas spermatozoa.

Total Spermatozoa Motil

Keberhasilan inseminasi buatan juga ditentukan oleh jumlah spermatozoa yang motil secara progresif dalam suatu ejakulat semen. Rata-rata total spermatozoa motil pasca *thawing* dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata dari Jumlah Total Spermatozoa Motil Pasca *Thawing*

Perlakuan	Rata-rata Total Spermatozoa Motil (Juta/ml)
P0	30,75 ± 11,43
P1	92,25 ± 27,16
P2	87,75 ± 25,01
P3	67,5 ± 21,21
Nilai Harapan	80

Berdasarkan perhitungan total spermatozoa motil pasca *thawing* diperoleh rata-rata total spermatozoa motil dari nilai terkecil hingga terbesar yaitu, P0 sebesar 30,75 ± 11,43 juta/ml, P3 sebesar 67,5 ± 21,21 juta/ml, P2 sebesar 87,75 ± 25,01 juta/ml dan P1 sebesar 92,25 juta/ml. Nikhbakht and Saharkhiz (2011) menjelaskan bahwa jumlah spermatozoa motil dapat dihitung dengan mengalikan konsentrasi spermatozoa dengan spermatozoa yang motil progresif. Hasil analisa total spermatozoa motil menggunakan analisa *chi square* menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) antar perlakuan. P1 dan P2 memiliki nilai rata-rata total spermatozoa motil lebih tinggi dibandingkan nilai harapan yang telah ditentukan.

Nilai harapan 80 juta spermatozoa/ml ditentukan berdasarkan SNI Semen Beku Kambing. Konsentrasi spermatozoa dalam dosis straw adalah 50 juta/dosis straw mini (200 juta/ml) dengan persentase motilitas individu sebesar 40% (BSN, 2014). Semen beku kambing P1 (TKT + 7% Gliserol) dan P2 (TKT + 14% Gliserol) masih layak digunakan untuk IB. Tetapi, semen beku P0 dan P3 tidak dapat digunakan karena memiliki total spermatozoa motil di bawah nilai harapan yang telah ditentukan.

Semen beku yang ditambahkan gliserol sebanyak 7% (P1) dan 14% (P2) dapat digunakan untuk inseminasi walaupun memiliki rata-rata *post thawing motility* yang rendah, yaitu dibawah 40%. Hal ini dikarenakan konsentrasi yang dibuat dalam satu mini straw adalah sebesar 75 juta spermatozoa, sehingga apabila konsentrasi tersebut dikalikan dengan persentase motilitas pasca *thawing* diperoleh nilai total

spermatozoa motil yang masih di atas nilai harapan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Penambahan persentase gliserol pada level 7% dapat meningkatkan kualitas motilitas pasca *thawing*, viabilitas pasca *thawing*, tingkat penurunan abnormalitas, serta total spermatozoa motil pada spermatozoa *swim up* kambing PE yang dibekukan dengan menggunakan metode vitrifikasi.

Saran

Penelitian ini menggunakan metode pembekuan secara vitrifikasi yang masih belum diketahui pengaruhnya secara pasti terhadap kualitas semen hasil pembekuan. Sehingga perlu adanya perbaikan metode pembekuan serta penelitian lanjutan yang meneliti seberapa besar pengaruh pembekuan vitrifikasi terhadap kualitas spermatozoa. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait lama simpan semen beku kambing PE yang diberi penambahan gliserol pada persentase yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Ariantje, O.S., T.L. Yusuf, D. Sajuthi, dan R.I. Arifiantini. 2013. Pengaruh Krioprotektan Gliserol dan Dimethylformamida dalam Pembekuan Semen Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Pengencer Tris Modifikasi. *JITV* 18 (4) : 239-250.
- _____. 2014. Kualitas Semen Cair Kambing Peranakan Etawah dalam Modifikasi Pengencer Tris dengan Trehalosa dan Rafinosa. *Jurnal Veteriner*. 15 (1) : 11-22.
- Ax, R., M. Dally, B. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez, and M.E. Bellin. 2008. Semen Evaluation in Reproduction in Farm Animal. E.S.E. Hafez (editor) 7th Edition. Lea and Febiger: 82-370.
- Azizah dan R.I. Arifiantini. 2009. Kualitas Semen Beku Kuda pada Pengencer Susu Skim dengan Konsentrasi Gliserol yang Berbeda. *Jurnal Veteriner*. 10 (2) : 63-70.
- Ciptadi, G. 2012. Bioteknologi Sel Gamet dan Kloning Hewan. Universitas

- Brawijaya (UB) Press. Malang. ISBN 978-602-203-241-0.
- Ducha, N., T. Susilawati, Aulanni'am dan S. Wahyuningsih. 2013. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Refrigerator dalam Pengencer CEP-2 dengan Suplementasi Kuning Telur. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7 (1) : 5-8.
- Endo, Y., Y. Fujii, K. Shintani, M. Seo, H. Motoyama and H. Funahashi. 2012. Simple Vitrification for Small Numbers of Human Spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*. 24 : 301-307
- Elder, K., and B. Dale. 2011. *In Vitro Fertilization 3rd Edition*. Cambridge University Press. New York, USA.
- Gardner, D.K., A. Weissman, C.M. Howles, Z. Shoham. 2009. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies Laboratory and Clinical Perspective*. Informa Healthcare Publishing. London, UK
- Hafez, E.S.E. 2008. *Reproduction in Farm Animal 7th Edition*. Blackwell Publishing. Kiawah Island, South Carolina, USA.
- Kulaksiz, R., U.C. Ari, A. Daskin, and A.G. Uner. 2013. The Effect of Different Glycerol Concentrations on Freezability of Semen From Angora, Kilis and Saanen Goats. *Slovak J. Anim. Sci.* 46 (2) : 39-44.
- Mumu, M.I. 2009. Viabilitas Semen Sapi Simental yang Dibekukan Menggunakan Krioprotektan Gliserol. *J. Agroland*. 16 (2) : 172-179.
- Nikbakht, R. and N. Saharkhiz. 2011. 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. *IJFS* 5 (3) : 168-173.
- Pamungkas, F.A. 2010. Pemanfaatan Metode Vitriifikasi untuk Kriopreservasi Oosit Mamalia. *Wartazoa*. 20 (3) : 112-118.
- Qureshi, M.S., D. Khan, A. Mushtaq, and S.S. Afridi. 2013. Effect of Extenders, Postdilution Intervals and Seasons on Semen Quality in Dairy Goats. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* (37) : 147-152
- Setiono, N., S. Suharyati dan P.E. Santosa. 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. 2013. *Pedoman Inseminasi Buatan pada Ternak*. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang. ISBN 978-602-203-458-2.