

Pengaruh Penyimpanan Pada Suhu 5°C Terhadap Motilitas, Persentase Hidup (Viabilitas) Dan Abnormalitas Semen Sapi Simmental

Bayu Islami Pasyah, Bayu Rosadi*, Darmawan

Fakultas Peternakan Universitas Jambi Program Studi Peternakan Fakultas Peternakan Universitas Jambi Jln. Jambi-Ma Bulian KM 15 Mendalo Darat Jambi 36361

*Penulis Koresponden : bayurosadi@unja.ac.id

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui bagaimana pengaruh terhadap penyimpanan pada suhu 5°C selama 3 hari mampu memberikan pengaruh yang baik terhadap motilitas, persentase hidup (viabilitas) dan abnormalitas semen sapi Simmental. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan. Perlakuan terdiri dari P₀= tanpa penyimpanan (kontrol), P₁= penyimpanan selama 24 jam, P₂= penyimpanan selama 48 jam dan P₃= penyimpanan selama 72 jam. Peubah yang diamati adalah viabilitas, motilitas dan abnormalitas. Analisis data menggunakan analisis sidik ragam, dengan uji lanjut Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu 5°C memberikan pengaruh yang sangat nyata terhadap nilai motilitas dan viabilitas, namun tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas semen sapi Simmental. Dapat disimpulkan bahwa lama penyimpanan yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa dan persentase hidup semen (viabilitas) sapi Simmental suhu 5°C adalah 24jam.

Kata kunci : sapi Simmental, penyimpanan, motilitas, viabilitas, abnormalitas

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of storage at 5°C on motility, viability and abnormality of simmental bovine semen. The design used was a completely randomized design with 4 treatments and 6 replications. The treatments consisted of P₀= fresh semen (control), P₁= storage for 24 hours, P₂= storage for 48 hours and P₃= storage for 72 hours. The observed variables were viability, motility and abnormality. Data analysis used analysis of variance, with Duncan's further test. The results showed that storage at 5°C decreased motility and viability (P<0.05), but had no significantly affect on abnormality (P>0.05). In conclusion, that the length of semen storage at 5°C than can maintain motility and viability of simmental bovine spermatozoa is 24 hours.

Keywords: simmental cattle, storage, motility, viability, abnormality

Pendahuluan

Sapi Simmental merupakan salah satu bangsa sapi potong yang mempunyai pertumbuhan cepat. Sapi jenis ini merupakan sapi dwiguna, yaitu sapi yang menghasilkan susu dan daging. Banyak peternak di Indonesia yang memelihara Sapi Simmental untuk memenuhi tingginya kebutuhan daging sapi untuk masyarakat. Bibit Sapi Simmental yang unggul dapat diperoleh dengan melakukan program pemuliaan ternak melalui Inseminasi Buatan (IB).

Inseminasi buatan adalah suatu cara untuk memasukan semen segar

atau semen beku yang telah diencerkan dan telah diperoses terlebih dahulu yang berasal dari ternak jantan ke saluran alat kelamin betina dengan menggunakan metode dan alat khusus yang disebut insemination gun (Hasibuan, 2009). Kualitas semen sapi pejantan mempunyai peranan yang sangat penting dalam pelaksanaan perkawinan, baik secara alami maupun IB.

Banyak faktor yang dapat menurunkan kualitas semen baik itu dari proses pengolahan, distribusi semen itu sendiri hingga tahap penyimpanan dalam kontainer. Masalah

yang sering menyebabkan penurunan kualitas semen adalah pada proses pengolahan terutama pada tahap penyimpanan suhu dingin. Menurut Vishwanath dan Shannon (2000) keuntungan yang utamadariteknologi penyimpanan semen cair adalah jika kejadian penurunan fertilitas pada penyimpanan 5°C atau suhu kamar dapat diiadakan atau direduksi.

Prinsiputama penyimpanan (preservasi) semen terkait dengan upaya memperpanjang daya hidup spermatozoa adalah menurunkan derajat metabolisme melalui penyimpanan pada suhu rendah. Kerusakan semen yang terjadi saat preservasi pada suhu rendah merupakan kendala utama dalam upaya mempertahankan kualitas semen.

Motilitas adalah daya gerak spermatozoa yang dapat dijadikan sebagai acuan dalam penilaian kualitas spermatozoa. Daya gerak progresif ini mempunyai peranan yang penting untuk keberhasilan fertilisasi. Motilitas spermatozoa pada sapi yang fertil adalah 50-80% dan bergerak progresif. Pada penyimpanan suhu rendah spermatozoa dalam bentuk beku menyebabkan penurunan motilitas. Penurunan kualitas spermatozoa bisa terjadi karena adanya kerusakan strukturmembran selama endinginan sehingga proses metabolisme spermatozoa terganggu (Susilawati, 2005).

Persentaseviabilitas merupakan perhitungan persentase yang membandingkan spermatozoa hidup dengan spermatozoa mati sehingga dapat menentukan baik atau tidaknya kualitas spermatozoa. Viabilitas adalah daya hidup spermatozoa. Viabilitas atau daya hidup spermatozoa dapat mengalami perubahan selama

penyimpanan, selama penyimpanan viabilitas spermatozoa dapat mengalami penurunan hal ini disebabkan meningkatnya jumlah spermatozoa yang rusak dan mati maka dari itu perlu dilakukan penyimpanan yang baik seperti penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin. Keuntungan utama penyimpanan spermatozoa pada suhu dingin adalah mencegah kerusakan terkait dengan pembekuan, memastikan viabilitas semen lebih tinggi (Crespilho et al, 2014).

Abnormalitas spermatozoa merupakan kelainan fisik dari spermatozoa yang terjadi karena pada saat proses pembentukan spermatozoa dalam tubuli seminiferi maupun karena proses perjalanan spermatozoa melalui saluran-saluran organ kelamin jantan. Abnormalitas spermatozoa dibagi menjadi dua yaitu abnormalitas primer dan sekunder. Abnormalitas primer terjadi karena adanya kegagalan dalam proses spermatogenesis di tubuli seminiferus dikarenakan factor keturunan dan pengaruh lingkungan yang buruk. Bentuk dari abnormalitas primer meliputi kepala besar (macrocephalus) atau kepala kecil (microcephalus), kepala pendek, lebar, dan ekor ganda. Adapun abnormalitas sekunder terjadi selama proses penyimpanan atau kriopreservasi spermatozoa. Bentuk abnormalitas sekunder meliputi bagian ekor yang melipat, adanya butiran-butiran sitoplasmik proksimal atau distal, dan selubung akrosom yang terlepas dari kepala tanpa adanya ekor, dan ekor yang terputus (Garner dan Hafez,2000).

Berdasarkan hal diatas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh penyimpanan dengan suhu 5°C terhadap motilitas, viabilitas dan abnormalitas semen sapi

Simmental.

Metode Penelitian

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fakultas Peternakan Universitas Jambi. Penelitian di mulai dari 14 September sampai 27 Oktober 2020.

Materi dan Peralatan

Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen sapi Simmental, batu es, NaCl fisiologis dan eosin negrosin. Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah gelas beaker, termos es, refrigerator suhu 5°C, mikroskop, objek glass, dan cover glass.

Koleksi dan Pengenceran Semen Sapi Simmental

Semen ditampung dari sapi jantan Simmental berumur 4 tahun menggunakan vagina buatan. Semen segar selanjutnya diencerkan dengan dengan larutan tris sitrat kuning telur. Komposisi bahan pengencer tris sitrat kuning telur yang digunakan terdiri dari kuning telur 20 ml, asam sitrat 1,86 g, fruktosa 1,37, antibiotik (penisilin 0,1 100.000 IU/100ml dan streptomisin 0,1 g), aquades 100 ml. Pengenceran dilakukan sampai mencapai konsentrasi akhir 10^8 spermatozoa/ml.

Penyimpanan Semen

Semen yang telah diencerkan disimpan dalam tabung plastik ukuran 1,5 ml diisi 0,5 ml larutan semen. Larutan ini disimpan dalam refrigerator bersuhu 5°C dengan lama penyimpanan sesuai perlakuan.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 4 perlakuan dan 6 ulangan. Perlakuan disusun berdasarkan lama penyimpanan sebagai berikut:

P0 : semen segar (kontrol)

P1 : penyimpanan selama 24 jam,

P2 : penyimpanan selama 48 jam,

P3 : penyimpanan selama 72 jam.

Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini meliputi motilitas, persentase hidup (viabilitas) dan abnormalitas.

Motilitas

Motilitas dihitung menggunakan metode estimasi (Junaedi *et al* 2016). Motilitas spermatozoa diamati dengan cara meletakkan satu tetes semen ditambah 10 tetes NaCl fisiologis. Motilitas spermatozoa dihitung dengan estimasi dari lima lapang pandang, dinyatakan dalam persentase.

Viabilitas

Penghitungan viabilitas menggunakan pewarnaan eosin negrosin. Sebanyak 2 tetes larutan eosin negrosin ditempatkan pada gelas objek bersih, satu tetes semen dicampurkan kedalam larutan eosin negrosin, selanjutnya diulas memakai gelas objek lainnya. Perhitungan persentase hidup didasarkan atas perbandingan jumlah spermatozoa yang hidup (kepala tidak berwarna) dengan total spermatozoa yang dihitung. Jumlah total spermatozoa yang diamati minimal 200 setiap pengamatan.

Abnormalitas Spermatozoa

Abnormalitas adalah penyimpangan dari bentuk morfologi normal spermatozoa yang dapat menyebabkan penurunan daya fertilitasnya. Penghitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan menggunakan pewarnaan yang sama dengan spermatozoa hidup. Jumlah spermatozoa yang dihitung minimal 200 setiap pengamatan.

Analisis Data

Data yang didapatkan dari setiap peubah yang diamati analisis dengan sidik ragam, Bila perlakuan berpengaruh nyata dan berpengaruh sangat nyata, dilakukan uji lanjut Duncan (Steel dan Torrie, 1993).

Hasil Dan Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam, diperoleh rata-rata nilai motilitas, viabilitas dan abnormalitas semen sapi Simmental dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan Nilai Motilitas, Viabilitas dan Abnormalitas

Peubah	Perlakuan				Ket
	P0	P1	P2	P3	
Motilitas	56,83±6,46 ^a	37,83±4,83 ^b	31,50±5,89 ^b	19,00± 3,58 ^c	P< 0,05
Viabilitas	68,67±5,16 ^a	56,17±5,30 ^b	39,33±6,62 ^c	25,83±6,34 ^d	P< 0,05
Abnormalitas	8,00±1,00	7,67±0,81	7,50±1,04	7,50±1,04	P> 0,05

Ket: - Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)

Motilitas

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama penyimpanan semen sapi Simmental pada suhu 5°C memberi pengaruh yang nyata (P<0,05) terhadap nilai motilitas semen sapi Simmental. Angka motilitas P0 berbeda sangat nyata terhadap P1, P2 dan P3. Nilai Motilitas tertinggi diperoleh pada P0 yakni 56,83% dan diikuti P1: 37,83%, P2: 37,83% dan P3:31,50%. Hal Ini terjadi karena P0 merupakan semen segar. Penurunan motilitas secara signifikan terjadi setelah penyimpanan 48 jam, pada penyimpanan 24 jam belum terjadi penurunan. Hal ini sesuai dengan studi pada domba yang menunjukkan bahwa refrigerasi mempertahankan viabilitas spermatozoa domba selama 48 jam tetapi motilitas menurun setelah 24 jam (Bergstein-Galan et al., 2018), dapat digunakan untuk IB sampai 3 hari penyimpanan walaupun fertilitasnya juga menurun setelah penyimpanan selama 24 jam (O'Hara et al., 2010). Pada P1, P2 dan P3 memiliki nilai yang lebih

rendah dibandingkan dengan P0 dan rata-rata nilai motilitas (36,29%) yang dihasilkan tidak sesuai dengan syarat minimal motilitas semen yakni 40%. Hal ini di dukung dengan pendapat Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa besaran persentase motilitas individu sapi yang normal (fertile) mempunyai motilitas individu 40- 75% dan motilitas spermatozoa di bawah 40% menunjukkan nilai semen yang kurang baik dan berhubungan dengan infertilitas. Pada perlakuan yang hampir sama, Samsudewa dan Suryawijaya (2008) mendapatkan persentase motilitas spermatozoa tertinggi yaitu 45% sapi Simmental.

Penurunan motilitas semen pada penelitian ini dapat di sebabkan oleh waktu penyimpanan yang terlalu lama yang akan menyebabkan aktivitas metabolisme meningkat sehingga banyak energi yang habis dengan cepat, dengan habisnya energi akan menyebabkan penurunan pH akibat peningkatan asam laktat yang bersifat racun bagi semen yang akhirnya

menyebabkan kematian. Situmorang (2002) menambahkan bahwa penurunan motilitas spermatozoa setelah pendinginan di duga karena turunnya kandungan phospholipid yang merupakan komponen membran sel spermatozoa, sehingga antar perlakuan memiliki penurunan nilai yang signifikan akibat dari lama penyimpanan yang dilakukan. Menurut Sugiarti et al (2004) proses pendinginan pada suhu 5°C akan menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa akibat adanya asam laktat sisa metabolisme sel yang menyebabkan kondisi medium menjadi semakin asam karena penurunan pH.

Viabilitas

Penentuan spermatozoa hidup atau mati didasarkan pada pengamatan bagian kepala spermatozoa, pada spermatozoa yang hidup (membran utuh) kepala tidak menyerap warna, spermatozoa yang mati (membran tak utuh) menyerap warna. Perlakuan lama penyimpanan semen sapi Simmental pada suhu 5°C memberi pengaruh yang nyata ($P < 0,05$) terhadap viabilitas semen sapi Simmental. Viabilitas P0 berbeda terhadap P1, P2 dan P3. Nilai viabilitas tertinggi diperoleh pada P0 yakni 68,67%, selanjutnya diikuti P1(56,17%), P2(39,33%) dan P3(25,83%). Pada penelitian ini terjadi penurunan motilitas secara signifikan setelah penyimpanan selama 48 jam, sedangkan persentase hidup tidak berbeda. Artinya, terdapat sebagian spermatozoa yang hidup tetapi tidak motil yang jumlahnya cenderung meningkat seiring lama penyimpanan. Penelitian lain menyimpulkan bahwa penyimpanan spermatozoa pada suhu 5°C meningkatkan daya tahan dan mempertahankan fertilitas spermatozoa (Kaneko et al., 2009) tetapi lama

penyimpanan mempengaruhi motilitas dan viabilitas spermatozoa (Sariozkan et al., 2014). Dari hasil yang di dapatkan pada perlakuan P2 dan P3 lebih rendah di bandingkan dengan P0 dan P1, semen pada P0 dan P1 masih dapat digunakan karena masih dalam syarat minimal persentase hidup semen yakni 50%. Semen P2 dan P3 tidak dapat digunakan dalam IB karena tergolong rendah yakni dibawah 50%. Hal ini sesuai dengan pendapat Menurut Toelihere (1993) yang menyatakan bahwa semen yang baik memiliki viabilitas diatas 50%. Proses penyimpanan yang lebih panjang menunjukkan nilai persentase spermatozoa hidup yang lebih rendah dibandingkan dengan penyimpanan yang lebih pendek, hal ini disebabkan karena spermatozoa banyak mengalami kematian akibat adanya tekanan pada suhu yang cepat tanpa adanya waktu tepat untuk penyesuaian diri.

Pendinginan dengan suhu 5°C selama 72 jam tidak mampu mempertahankan angka persentase spermatozoa hidup. Kristal-kristal es yang terbentuk saat proses pendinginan semen juga dapat merusak spermatozoa. Konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein pada dinding sel spermatozoa sehingga permeabilitas membrane sel akan berubah dan menyebabkan kematian sel. Menurut Yudhaningsih (2004), suhu yang rendah akan mengakibatkan bocornya substansi vital dalam spermatozoa sehingga enzim intraseluler, lipoprotein, ATP, kalium intraseluler dan lemak berfosfor berkurang dan menyebabkan kerusakan membrane plasma. Menurut Toelihere (1993) spermatozoa yang hidup memiliki membrane utuh meskipun lingkungan disekitarnya

berwarna, kepala tetap tidak akan berwarna (transparan) dikarenakan permeabilitas membrane masih normal, sedangkan spermatozoa yang mati karena membran tidak mampu untuk mencegah masuknya pewarna yang telah rusak. Sebagai akibatnya, kepala spermatozoa akan berwarna sesuai dengan warna eosin yaitu merah muda. Susilawati (2013) menyatakan bahwa kondisi spermatozoa yang mudah mengalami kerusakan pada saat perlakuan maupun penyimpanan dapat berakibat spermatozoa tidak mampu mempertahankan kualitasnya.

Abnormalitas (%)

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan lama penyimpanan semen sapi Simmental pada suhu 5°C memberi pengaruh yang tidak nyata ($P>0,05$) terhadap abnormalitas semen sapi Simmental. Berdasarkan hasil yang di dapat menunjukkan bahwa abnormalitas semen sapi Simmental P0 tidak berbeda nyata ($P>0,05$) terhadap P1, P2 dan P3. Penyimpanan semen pada suhu 5°C tidak berpengaruh nyata terhadap abnormalitas spermatozoa sapi Simmental. Hal ini menunjukkan bahwa penyimpanan pada suhu 5°C selama 72 jam tidak berdampak terhadap kerusakan morfologi spermatozoa. Kerusakan struktur spermatozoa yang diduga terjadi selama proses penyimpanan tidak mengubah morfologi spermatozoa, sehingga persentase abnormalitas tidak terpengaruh. Tingkat abnormalitas morfologi 8-10% tidak mempunyai pengaruh yang berarti bagi fertilitas, tetapi abnormalitas lebih dari 25% dari satu ejakulat menyebabkan penurunan fertilitas (Bearden & Fuquay, 1997). Lama penyimpanan menunjukkan bahwa angka rata-rata abnormalitas semen masih dibawah 10% yakni

(5,37%). Menurut pendapat Ihsan (2009) yang menjelaskan bahwa semen yang dapat dipakai IB memiliki abnormalitas spermatozoa tidak boleh lebih dari 20% dan jika abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% maka akan terjadi penurunan fertilitasnya. Kemudian Suyadi et al (2012) juga menambahkan bahwa peningkatan angka abnormalitas disebabkan pada saat pembuatan preparat sebelum dilakukan pengamatan dan juga disebabkan peroksidasi lipid. Karena dalam proses pembuatan preparat ulas dan proses penyimpanan dapat menyebabkan kelainan atau abnormalitas dari spermatozoa tersebut, pembuatan preparat ulas menyebabkan spermatozoa berbentuk ekor bergulung, leher patah, kepala dan leher putus. Menurut Yani et al (2001), semakin lama waktu penyimpanan maka semakin tinggi persentase abnormalitas yang disebabkan oleh stres dingin dan ketidakseimbangan tekanan osmotik akibat dari proses metabolik yang terus berlangsung selama penyimpanan.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas dapat disimpulkan bahwa :

1. penyimpanan dengan suhu 5°C menurunkan motilitas dan viabilitas tetapi tidak mempengaruhi abnormalitas spermatozoa sapi Simmental.
2. Lama penyimpanan terbaik yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa dan persentase hidup semen Sapi Simmental pada suhu 5°C adalah selama 24 jam.

Daftar Pustaka

Bearden HJ, Fuquay J.W. 1997. Applied Animal Reproduction. Reston Publishing Company Inc. Printice

- Hall Company, Reston Virginia.
- Bergstein-Galan TG, Weiss RR., Barbosa TSR, Kozicki LE, Bicudo SD. 2018. Ovine epididymal spermatozoa preservation in liquid state with or without seminal plasma. *Ciência Rural* 48.
- Crespilho AM, Safilho MF, Dell'Aqua Jr JA, Nichi M, Monteiro GA, Avanzi BR, Martins A, Papa FO. 2014. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock* 149 (1-2): 1-6.
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. *Reproduction in Farm Animals*.
- Hasibuan, Z.F. 2009. Penggunaan Air Kelapa Sebagai Penyeimbang Fruktosa dalam Pengencer Terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Simmental. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Ihsan NM. 2009. Bioteknologi Reproduksi Ternak. Universitas Brawijaya. Malang.
- Junaedi, Arifiantini I, Sumantri C, Gunawan A. 2016. Penggunaan Dimethyl Sulfoxide Sebagai Krioprotektan dalam Pembekuan Semen Ayam Kampung. *Jurnal Veteriner* 17 (2) : 300-308.
- Kaneko T, Fukumoto K, Haruguchi Y, Kondo T, Machida H, Koga M, Nakagawa Y, Tsuchiyama S, Saiki K, Noshiya S, Nakagata N. 2009. Fertilization of C57BL/6 mouse sperm collected from cauda epididymies after preservation or transportation at 4° C using laser microdissected oocytes. *Cryobiology* 59,59-62.
- Keren K. 2011. O'Hara L, Hanrahan J.P, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans ACO, Lonergan P. 2010. Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology* 73, 541-549.
- Samsudewa D, Suryawijaya A. 2008. Pengaruh Berbagai Metode Thawing Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. 1: 88 - 92
- Sariozkan S, Ozdamar S, Turk G, Canturk F, Yay A. 2014. In vitro effects of l-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology* 68 : 349-353.
- Situmorang, P. 2002. Pengaruh penambahan eksogenous phospholipid ke dalam pengencer tris dengan tingkat kuning telur yang berbeda pada daya hidup spermatozoa sapi. *JITV* 7(3): 181 - 187.
- Sugiarti T, Triwulanningsih E, P Situmorang, Sianturi RG, Kusumaningrum DA. 2004. Penggunaan Katalase dalam Produksi Semen Dingin Sapi. Puslitbang Peternakan. Bogor.
- Susilawati. 2005. Motilitas dan Proses Pembentukan Semen Segar menjadi Semen Beku. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya. Malang.
- Suyadi A, Rachmawati N, Iswanto. 2012. Pengaruh α -Tocopherol yang Berbeda dalam Pengencer Dasar Tris Aminomethane kuning

Telur Terhadap Kualitas Semen Kambing Boer yang Disimpan pada Suhu 50C. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*. 22 (3):1-8.

Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Angkasa. Bandung.

Viswanath R, Shannon P. 2000. Storage of Bovine Semen In Liquid and Frozen State. *Anim. Repord. Sci.* 62: 23-53.

Yani A, Nuryadi, Pratiwi T. 2001. Pengaruh Tingkat Substitusi Santan Kelapa pada Pengencer Santan Kelapa terhadap Kualitas Semen Kambing Peranakan Etawa (PE). Skripsi. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya.

Yudhaningsih, H. 2004. Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Madura Menggunakan Motilitas dan Pengencer yang Berbeda Selama Proses Pembekuan Semen. Skripsi. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.