

Kualitas Spermatozoa Post Thawing dari Semen Beku Sapi Perah

Engki Zelpina¹, Bayu Rosadi¹ dan Teguh Sumarsono¹

¹Fakultas Peternakan Universitas Jambi, Jl. Jambi-Ma. Bulian KM 15 Mendalo, Jambi
email: engki_zelpina@yahoo.com

Intisari

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai suhu thawing terhadap kualitas spermatozoa dari semen beku sapi perah Fries Holland (FH). Rancangan percobaan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 5 kali ulangan. Perlakuan yang dilakukan meliputi: semen beku yang *dithawing* selama 30 detik pada air dengan suhu 33 °C (P1), suhu 35 °C (P2), suhu 37 °C (P3), suhu 39 °C (P4), suhu 41 °C (P5). Peubah yang di amati meliputi persentase motilitas spermatozoa, viabilitas dan *recovery rate*. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu *thawing* yang berbeda mempengaruhi motilitas, viabilitas, *recovery rate* spermatozoa yang dibekukan ($P < 0,05$). Motilitas, *recovery rate* P4 lebih tinggi dibandingkan P2, P1 dan P5 ($P < 0,05$), tetapi tidak berbeda dengan P3 ($P > 0,05$). Viabilitas P4 lebih tinggi dibandingkan P1 dan P5 ($P > 0,05$) tetapi tidak berbeda dengan P2 dan P3 ($P > 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa suhu thawing mempengaruhi motilitas, viabilitas, *recovery rate* spermatozoa yang dibekukan. Kualitas yang terbaik pada semen beku sapi perah Fries Holland (FH) dengan menggunakan suhu thawing 39 °C dan 37 °C selama 30 detik.

Kata kunci : spermatozoa, semen beku, sapi perah, thawing

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of various thawing temperatures to the sperm quality of FH dairy cow frozen semen. The experimental design used was completely randomized design (CRD) with 5 treatments and 5 replications. The thawing treatments were 30 seconds at 33 °C (P1), 35 °C (P2), 37 °C (P3), 39 °C (P4), 41 °C (P5). Observed variables were sperm motility, viability and recovery rate. Data were analyzed using analysis of variance. The results showed that different thawing temperatures affect the motility, viability, recovery rate of frozen spermatozoa ($P < 0.05$). Motility and recovery rate of P4 was higher ($P < 0.05$) than P2, P1 and P5, but did not differ ($P > 0.05$) with P3. Viability of P4 was higher ($P > 0.05$) than P1 and P5 but did not differ ($P > 0.05$) with P2 and P3. In conclusion, thawing at 39 °C and 37 °C for 30 seconds had best semen quality of FH frozen semen.

Keywords : spermatozoa, frozen semen, dairy cow, thawing

Pendahuluan

Inseminasi Buatan (IB) merupakan proses perkawinan yang dilakukan dengan campur tangan manusia, yaitu mendeposisikan semen ke dalam saluran reproduksi betina agar terjadi proses fertilisasi. Aplikasi IB secara meluas telah

dimulai di Indonesia sejak tahun 1970-an terutama pada sapi perah.

Prosedur pelaksanaan IB mulai dari pengamatan berahi, handling semen beku, thawing semen beku sampai dengan pelaksanaan inseminasi sangat mempengaruhi keberhasilan perkawinan. Metode thawing semen beku menjadi salah satu faktor yang sangat menentukan

karena penggunaan metode thawing yang tidak tepat akan menyebabkan kerusakan spermatozoa sehingga menurunkan kualitas semen (Evans dan Maxwell, 1976). Thawing merupakan pencairan kembali semen yang telah dibekukan sebelum dilakukan (IB). Suhu dan lama thawing mempunyai pengaruh besar terhadap keadaan spermatozoa khususnya keutuhan spermatozoa dalam semen. Kombinasi suhu thawing yang baik adalah yang dapat mencegah kerusakan spermatozoa, sehingga tetap memiliki kemampuan membuahi ovum yang tinggi.

Metode thawing yang dikembangkan beragam. Deka dan Rao (1987) menyatakan bahwa suhu thawing di atas 37 °C akan meningkatkan daya hidup spermatozoa, tetapi bila melebihi batas waktu kritis akan bersifat fatal pada sel spermatozoa. Persentase motilitas tertinggi diperoleh pada suhu thawing 37 °C (Pace dkk, 1981). Suhu yang tinggi dalam media thawing akan menyebabkan proses metabolisme spermatozoa meningkat sehingga memerlukan energi yang tinggi pula (Soepriondho, 1985).

Pada penelitian ini dilakukan pengujian kualitas spermatozoa post thawing dari semen beku sapi perah Fries Holland (FH) menggunakan suhu thawing yang berbeda. Hasil penelitian ini diharapkan diperoleh metode thawing yang menghasilkan kualitas spermatozoa sapi FH terbaik untuk IB.

Materi dan Metode

Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan dan Laboratorium

Pusat Pengembangan Agribisnis Terpadu Universitas Jambi, 30 Oktober sampai dengan 5 November 2013.

Semen Beku

Semen beku dari pejantan sapi perah FH yang digunakan sebanyak 35 straw dari BIB Lembang kode bull 307101 No Registrasi AH0.01.INAJ 0280 33081.

Thawing

Menyiapkan penangas air dan mengatur suhu air di dalamnya hingga suhu yang telah ditentukan. Mengambil straw dengan penjepit (pinset) dari kontainer dan memasukkannya ke dalam penangas air selama 30 detik.

Rancangan Percobaan

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan (P1, P2, P3, P4, P5) dan 5 kali ulangan. Perlakuan adalah suhu thawing sebagai berikut:

- P1: Suhu 33 °C,
- P2: Suhu 35 °C
- P3: Suhu 37 °C
- P4: Suhu 39 °C
- P5: Suhu 41 °C

Lama thawing seragam pada semua perlakuan yaitu 30 detik.

Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah Motilitas, Viabilitas, Recovery Rate. Recovery Rate adalah kemampuan pemulihan spermatozoa setelah pembekuan dengan membandingkan persentase sperma motil pada semen segar dan ekuilibrisasi dengan pasca thawing (Garner dan Hafez, 2000).

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam. Untuk melihat perbedaan antarperlakuan dilakukan uji lanjut Duncan.

Hasil dan Pembahasan

Motilitas Spermatozoa

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa semen beku yang digunakan memenuhi syarat untuk disimpan dan diinseminasikan, dengan nilai motilitas spermatozoa berkisar antara 42,4 - 51,0 % (Tabel 1). Motilitas spermatozoa setelah thawing minimal 40 % jika kurang

dari 40 % maka semen beku tersebut tidak layak diinseminasikan. Arifiantini dkk (2004) melaporkan motilitas spermatozoa pada sapi FH dengan menggunakan pengencer kacang kedelai (KK), tris sukrosa (TS) dan tris masing-masing $50,20 \pm 7,07$; $46,04 \pm 3,54$ dan $43,02 \pm 7,68\%$.

Tabel 1. Rataan Persentase Motilitas Spermatozoa

Perlakuan	Rataan
P1	42,8 ± 2,58 ^b
P2	45,4 ± 1,51 ^b
P3	49,2 ± 1,09 ^a
P4	51,0 ± 2,64 ^a
P5	42,4 ± 2,50 ^b

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

Perlakuan metode thawing pada semen beku sapi perah FH berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa ($P < 0,05$). Evaluasi motilitas spermatozoa post thawing adalah salah satu parameter yang banyak digunakan untuk menentukan kualitas semen sapi yang akan digunakan untuk inseminasi buatan. Syarat minimal motilitas individu semen post thawing agar semen dapat dipergunakan dalam inseminasi buatan adalah 40 % (Garner dan Hafez, 1993).

Thawing yang dilakukan pada perlakuan P4 dan P3 dengan suhu 39 °C dan 37 °C selama 30 detik memperlihatkan persentase motilitas yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan pada perlakuan P1, P2 dan P5 dengan suhu 33 °C, 35 °C dan 41 °C selama 30 detik, sedangkan antara perlakuan P4 dan P3 yaitu suhu 39 °C dan 37 °C tidak berbeda ($P > 0,05$). Diduga pada kisaran suhu tersebut metabolisme spermatozoa

berjalan sempurna karena sesuai dengan suhu fisiologis yang normal pada sapi perah. Pada suhu fisiologis, aktivitas reaksi enzimatik yang berlangsung selama metabolisme sel berlangsung optimal. Proses pembentukan dan pemanfaatan sumber energi kimiawi spermatozoa diantaranya digunakan untuk energi gerak berlangsung dengan baik. Hal ini termanifestasi pada motilitas spermatozoa. Menurut Einarsson (1992) proses *thawing* dapat mempengaruhi stabilitas dan fungsi-fungsi hidup membran sel spermatozoa.

Hafs dan Elliot (1954) dalam Toelihere (1993) menyatakan bahwa thawing pada air bersuhu 38 °C sampai 40 °C menghasilkan daya tahan hidup sperma yang lebih baik bila dibandingkan dengan pada suhu rendah. Menurut Sayoko dkk (2007), lama thawing 30 detik memberikan hasil yang lebih baik terhadap persentase spermatozoa hidup dari pada thawing selama 15 detik.

Perlakuan P1 dan P2 rataan motilitas spermatozoa mengalami penurunan, hal ini disebabkan karena perlakuan suhu thawing pada P1 dan P2 yang digunakan suhu 33 °C dan 35 °C selama 30 detik. Pada suhu rendah pengeluaran krioprotektan sempurna tetapi metabolisme berjalan tidak optimal sehingga motilitas spermatozoa yang dihasilkan mengalami penurunan. Sedangkan pada perlakuan P5 rataan motilitas spermatozoa juga mengalami penurunan hal ini disebabkan suhu tinggi dibandingkan perlakuan lainnya yaitu 41°C selama 30 detik. Suhu thawing yang tinggi berpengaruh terhadap motilitas spermatozoa karena pada proses thawing metabolisme berjalan dengan optimal tetapi proses pengeluaran krioprotektan tidak terlansung sempurna dapat mengakibatkan keracunan bagi spermatozoa dan kerusakan spermatozoa sehingga menyebabkan penurunan motilitas spermatozoa.

Menurut Soepriondho (1985), suhu yang tinggi dalam media thawing akan menyebabkan proses metabolisme spermatozoa meninggi

sehingga memerlukan energi yang tinggi pula. Kondisi demikian menyebabkan spermatozoa akan cepat kehilangan energi sehingga berakibat kematian pada spermatozoa. Suhu yang rendah akan mempengaruhi metabolisme spermatozoa. Watson (1996) menjelaskan suhu rendah juga akan mengakibatkan struktur fosfolipid membran plasma akan berubah dari fase cair menjadi fase gel.

Viabilitas (Persentase Hidup)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu thawing nyata mempengaruhi persentase viabilitas spermatozoa semen beku sapi perah FH ($P < 0,05$). Thawing yang dilakukan pada perlakuan P4, P3 dan P2 memperlihatkan persentase viabilitas yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan pada perlakuan P1 dan P5 sedangkan antara perlakuan P4, P3 dan P2 tidak nyata berbeda ($P > 0,05$). Angka persentase pengamatan viabilitas terbaik pada perlakuan P4, P3 dan P2, menghasilkan nilai pengamatan viabilitas yang tinggi yaitu $59,20 \pm 4,20$, $55,60 \pm 3,57$ dan $53,20 \pm 4,38$.

Tabel 2. Rataan Persentase Viabilitas Spermatozoa

Perlakuan	Rataan
P1	$51,0 \pm 4,12^b$
P2	$53,2 \pm 4,38^{ab}$
P3	$55,6 \pm 3,57^a$
P4	$59,2 \pm 4,20^a$
P5	$50,8 \pm 3,52^b$

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

Spermatozoa yang memiliki persentase hidup yang tinggi menandakan bahwa membran plasma masih utuh secara fisik, sehingga organel sel spermatozoa akan terlindungi, kebutuhan zat- zat

makanan dan ion- ion untuk proses metabolisme tersedia. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu dengan baik mengatur lalu lintas

substrat dan elektrolit masuk dan keluar dari sel.

Darnel dkk (1990) menyatakan bahwa terjadi perubahan suhu yang tidak sesuai secara ekstraseluler, maka permeabilitas fosfolipid hidrofilik rusak menyebabkan fluiditas membran terganggu sehingga terjadi kematian spermatozoa. Menurut Chandler dkk (1984) meningkatnya kecepatan perubahan pada saat *thawing* umumnya menghasilkan lebih banyak spermatozoa yang hidup. Hal ini dapat dicapai apabila melakukan *thawing* dengan temperatur air *thawing* yang cukup tinggi. Kecepatan perubahan selama *thawing* akan mengurangi tekanan terhadap spermatozoa karena spermatozoa melewati massa kritis (fasa transisi) dengan cepat pula sehingga spermatozoa yang hidup dan normal menjadi lebih banyak dan akibatnya angka konsepsi menjadi lebih baik. Kerusakan spermatozoa biasanya terjadi pada fase transisi. Hasil

penelitian Hidayatin (2002) menyatakan bahwa dibutuhkan 50% spermatozoa yang hidup dan motil untuk dipakai dalam IB. maka viabilitas pada perlakuan suhu *thawing* menunjukkan bahwa persentase viabilitas dalam kisaran normal. Spermatozoa yang memiliki persentase hidup yang tinggi menandakan bahwa membran plasma masih utuh secara fisik, sehingga organel sel spermatozoa akan terlindungi, kebutuhan zat-zat makanan dan ion-ion untuk proses metabolisme tersedia.

Recovery Rate

Hasil pengamatan recovery rate terhadap semen segar dan hasil ekuilibriasi spermatozoa semen beku sapi perah FH yang dithawing dengan suhu yang berbeda pada Tabel 3. Metode *thawing* pada semen beku sapi perah FH berpengaruh nyata terhadap recovery rate spermatozoa ($P < 0,05$).

Tabel 3. Rataan Persentase Recovery Rate Segar dan Ekuilibriasi

Perlakuan	Rataan	
	Segar	Ekuilibriasi
P1	61, 14 ± 3, 69 ^b	71, 33 ± 4, 31 ^b
P2	64, 85 ± 2, 16 ^b	75, 66 ± 2, 52 ^b
P3	70, 28 ± 1, 56 ^a	82, 00 ± 1, 82 ^a
P4	72, 85 ± 3,77 ^a	85, 00 ± 4, 40 ^a
P5	60, 57 ± 3,58 ^b	70, 66 ± 4, 18 ^b

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

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu *thawing* nyata ($P < 0,05$) mempengaruhi persentase motilitas spermatozoa semen beku sapi perah FH. *Thawing* yang dilakukan pada perlakuan P4 dan P3 k nyata memperlihatkan persentase motilitas yang lebih tinggi ($P < 0,05$)

dibandingkan pada perlakuan P1, P2 dan P5, sedangkan antara perlakuan P4 dan P3 tidak nyata berbeda ($P > 0,05$).

Keberhasilan pembekuan semen tidak hanya dinilai dari persentase motilitas setelah *thawing*, persentase spermatozoa yang dapat

pulih kembali setelah pembekuan yang memberikan gambaran keberhasilan dari proses pembekuan itu sendiri. Aktifitas metabolisme dan pergerakan sel spermatozoa sesudah thawing pada suhu ini berjalan normal mengakibatkan laju pemulihan spermatozoa dari pasca ekuilibrasi dan thawing tinggi. Perbedaan laju pemulihan kembali disebabkan oleh suhu yang digunakan pada saat thawing. Mole dkk (2003) menyatakan bahwa spermatozoa sangat cepat terpengaruh oleh perbedaan suhu baik selama proses pendinginan, pembekuan ataupun thawing. Pada saat ekuilibrasi spermatozoa akan beradaptasi dengan pengencernya, sehingga dapat menurunkan persentase motilitas spermatozoa pada saat pembekuan. Menurut Kacker dan Panwar (1996) ekuilibrasi

bertujuan melindungi spermatozoa dari kematian yang disebabkan oleh penurunan tekanan osmotik yang mengganggu keutuhan membran spermatozoa akibat pembekuan. Pada sapi ekuilibrasi biasanya dilakukan selama 4 jam dengan suhu 5 °C (Arifiantini dkk, 2004).

Menurut Kwon dkk (2002) kerusakan sel akibat pembekuan dapat terjadi karena dehidrasi, peningkatan konsentrasi elektrolit, serta terbentuknya kristal es intraseluler yang dapat mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan pada akhirnya spermatozoa kehilangan daya motilitasnya. Hilangnya daya motilitas spermatozoa selama proses pembekuan akan berpengaruh terhadap laju pemulihan (recovery rate) sperma setelah mengalami pencairan kembali.

Tabel 4. Rataan Penurunan dari Semen Segar dan ekuilibrasi Ke Pasca Thawing

Pengamatan		Perlakuan				
		P1	P2	P3	P4	P5
Segar	Motilitas Segar(%)	70	70	70	70	70
	Pasca Thawing(%)	42,80	45,40	49,20	51,00	42.40
	Penurunan (%)	38,85 ^b	35,14 ^b	29,70 ^a	27,14 ^a	39,42 ^b
Ekuilibra sasi	Pasca Ekuilibrasi(%)	60	60	60	60	60
	Pasca Thawing(%)	42,80	45,40	49,20	51,00	42.40
	Penurunan(%)	28,60 ^b	24,33 ^b	18,00 ^a	15,00 ^a	29,33 ^b

Ket: Superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0.05).

Berdasarkan Tabel 4. laju pemulihan kembali motilitas spermatozoa setiap perlakuan mengalami penurunan, P1 (38,85%), P2 (35,14%), P3 (29,70%) P4 (27,14%) dan P5 (39,42%) dan P1 (28,60%), P2 (24,33%), P3 (18,00%) P4 (15,00%) dan P5 (29,33%). Tingkat laju penurunan motilitas pada perlakuan P4 lebih rendah dibandingkan pada perlakuan yang lain, sedangkan tingkat

penurunan tertinggi diperoleh pada perlakuan P5. Thawing semen merupakan suatu prosedur yang sangat kritis, dan bila thawing dilakukan pada suhu yang tidak tepat akan menimbulkan kerusakan pada spermatozoa. Pada semen beku suhu thawing yang tepat sangat diperlukan, karena suhu thawing yang tepat dapat mengurangi efek

dari semen beku untuk mencapai suhu yang kritis pada saat thawing.

Menurut Devireddy dkk (2002) menyatakan bahwa penurunan kualitas semen setelah ekuilibrisasi dan setelah thawing dalam proses pembekuan semen dimulai saat penambahan krioprotektan, perubahan volume sel pada saat pembekuan diikuti peregangan dan pengkerutan membran plasma sebagai respon terhadap larutan hiperosmotik.

Pembekuan pada dasarnya adalah suatu proses pengeringan fisik di bawah titik beku. Bila mana suatu larutan dibekukan, maka zat pelarutnya berupa air akan membeku dan membentuk kristal-kristal es, sedangkan bahan terlarutnya tidak dapat bersatu dengan Kristal-kristal es tersebut, melainkan berakumulasi semakin pekat. Kristal-kristal es yang terdapat di dalam sel sperma ini dapat merusak secara mekanik, sedangkan konsentrasi elektrolit yang berlebihan akan melarutkan selubung lipoprotein pada dinding sel spermatozoa, sehingga pada saat pencairan kembali (*thawing*), permeabilitas membran selnya akan berubah dan mengakibatkan kematian sel (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Sifat semen beku yang sangat labil mengakibatkan kondisi membran itu sendiri yang memiliki tingkat kerentanan yang cukup tinggi. Selain itu diduga karena pengaruh *cold shock* ketika proses pembekuan. Proses pembekuan semen akan mengakibatkan kematian spermatozoa mencapai 30% dari jumlah spermatozoa segar atau setelah diencerkan dan kerusakan akibat pengaruh pendinginan (Goldman dkk, 1991).

Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Suhu *thawing* mempengaruhi motilitas, viabilitas dan *recovery rate* spermatozoa yang dibekukan.
2. Motilitas, viabilitas, *recovery rate* yang terbaik pada semen beku sapi Fries Holland (FH) dengan menggunakan suhu thawing 39 °C dan 37 °C selama 30 detik.

Daftar Pustaka

- Arifiantini, M.I. 2004. *Proses Produksi Semen Beku Kerbau dengan Sistem Minitub*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Datta, U., Sekar, M. C., Hembram, M. L., Dasgupta, R., 2009. Development of a New Method to Preserve Caprine Cauda Epididymal Spermatozoa in situ at 10 °C. *Proceedings. Departement of Veterinary Gynaecology & Obstetrics Faculty of Veterinary and Animal Sciences West Bengal University of Animal and Fishery Sciences. Kolkuta West Bengal. India.*
- Deka, B.C. and A. R. Rao. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation of goat semen. *Indian Vet.J.* 64:591-594.
- Devireddy, R.V., D.J. Swanlund, T. Olin, W. Vincente, M.H.T. Troedson, J.C. Bischof and K.P. Roberts. 2002. Cryo-preservation of equine sperm: Optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential

- scanning calorimetry. *Biologi of Reproduction* 66: 222-231.
- Djanuar, R. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Gadjah Mada University Press Yogyakarta.
- Einarsson S. 1992. Concluding Remarks. In: Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen stallion spermatozoa. Bor K, B Colenbrander, A Fazelli, J Pallevliet and L Malmgren (eds.) *Theriogenology* VI. 48th. 1997. Pp.531-536.
- Evans G and Maxwell WMC, 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. Butterworths. Sydney.
- Garner, D.L., E. and S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed B Hafez/ESE Hafez. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 96-109.
- Goldman, E. E., J.E. Ellington, F.B. Farrel, and R.H. Foote. 1991. Use Of Fresh And Frozen Thawed Bull Sperm In vitro. *Theriogenology* 35: 204.
- Hafez, E.S.E. 2000. B. Semen Evaluation dalam E.S.E. Hafez (ed). *Reproduction In Fram Animal*. Lea and Febiger. Philadelphia. 144 - 164.
- Kacker, R.N., and B.S. Panwar, 1996. *Textbook of Equine Husbandry*. 1st ed., Vikas Publishing House, London.
- Kwon, A.Y, H.J. K.O and C.S, Park. 2002. Effect of diluent component, freezing rate, thawing time and thawing temperature on AC acrosoma morphology and motility of frozen thawed boar semen. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 15: 247-249.
- Mackie, A.R.P., P. S. James, S. Ladha and R. Jones. 2001. Diffusion Barriers in Ram and Boar Sperm Plasma Membranes : Directionality of Lipid Diffusion Across The Posterior Ring. *Biology Reproduction*. Society for The Study of Reproduction, Inc.
- Partodiharjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Fakultas Kedokteran Veteriner jurusan Produksi. Institut Pertanian Bogor. Mutiara, Jakarta 499-557.
- Pace, M.M, J.J. Sullivan, F.I. Elliot, E.F. Graham, and G.H Coulter. 1981. Effect of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa fackaged in 0,5ml french straws. *J. Anim. Sci.* 53 (3) : 693-701.
- Soepriondho, Y. 1985 . Pengaruh Waktu dan Suhu Thawiing Semen Beku terhadap Angka Konsepsi pada Ternak Kerbau. Tesis. Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Salisbury GW and Van Demark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada sapi*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sayoko Y, M Hartono, dan PE Silitonga. 2007. Faktor-faktor yang Mempengaruhi Per-sentase Spermatozoa Hidup Semen Beku Sapi pada Berbagai Inseminator di Lampung Tengah. *Kumpulan Abstrak Skripsi Jurusan Produksi Ternak*. Fakultas Per-tanian. Universitas Lam-pung.

- 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.
- Sorenson Jr., A.M. 1979. *Laboratory Manual for Animal Reproduction*. 4th Ed. American Press. Boston. USA.
- Srianto, P. S. P., Madyawati, dan T. Sardjito. 2009. Kadar hormon dan mineral serum darah sapi pejantan di Balai Inseminasi Buatan Daerah. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Surabaya.
- Steel , R.G .D . and J.H . Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Toelihere, 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Watson, P. F. 1996. *Cooling of Spermatozoa and Freezing Capacity*. *Reprod. Dom. Anim.* 31 : 135 - 140.