

KUALITAS SEMEN CAIR SAPI LIMOUSIN SELAMA PENDINGINAN MENGUNAKAN PENGECER CEP-2 DENGAN PENAMBAHAN BERBAGAI KONSENTRASI SARI KEDELAI

Nanang Sugiarto, Trinil Susilawati, Sri Wahyuningsih
Bagian Produksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya, Malang
Email : trinil_susilawati@yahoo.com

ABSTRAK

Kuning telur sering digunakan dalam pengencer semen untuk proses pendinginan dan pembekuan, akan tetapi penggunaan kuning telur dapat menimbulkan resiko cemaran mikroorganisme patogen. Penelitian ini bertujuan untuk menguji sari kedelai pada pengencer basal CEP-2 pada semen cair Sapi Limousin selama pendinginan. Semen dibagi menjadi lima kelompok dan diencerkan dengan perbandingan 1:8 (semen:pengencer) dengan penambahan sari kedelai 7,5%, 10%, 12,5%, 15% (CEP-2+7,5% SK, CEP-2+10% SK, CEP-2+12,5% SK, CEP-2+15% SK) dan 10% kuning telur (CEP-2+10% KT). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kuning telur lebih baik dalam mempertahankan kualitas spermatozoa (motilitas, viabilitas dan abnormalitas) setelah 24 jam pendinginan. Motilitas dan viabilitas pada pengencer CEP-2+berbagai konsentrasi sari kedelai lebih rendah ($P<0,01$) dibandingkan CEP-2+10% KT, akan tetapi tidak terdapat perbedaan ($P>0,05$) pada persentase motilitas antara CEP-2+15% SK dan CEP-2+10% KT. Abnormalitas pada CEP-2+10% KT lebih rendah ($P<0,01$) dibandingkan CEP-2+berbagai konsentrasi sari kedelai. Total spermatozoa motil lebih tinggi ($P<0,01$) pada semua perlakuan dibandingkan dengan standar kriteria SNI yaitu 40 juta spermatozoa/mL. Penggunaan sari kedelai dalam pengencer CEP-2 (*Cauda Epididymal Plasma*) tidak bisa menyamai kuning telur sebagai krioprotektan ekstraseluler dalam mempertahankan kualitas spermatozoa selama pendinginan, namun CEP-2+15% SK memiliki kemampuan yang baik dalam mempertahankan motilitas spermatozoa dan total spermatozoa motil.

ABSTRACT

*Egg yolk is most commonly used in semen extender for preservation and cryopreservation but potential risk of xenobiotic contamination has raised question upon the use of egg yolk. Therefore, the present study was designed to evaluate soy milk CEP-2 based extender on liquid semen of Limousin during chilled preservation. Semen divided into five groups and diluted at 1/8 (semen/extender) with 7,5%, 10%, 12,5%, 15% soy milk respectively (CEP-2+7,5% SK, CEP-2+10% SK, CEP-2+12,5% SK, CEP-2+15% SK) and 10% egg yolk (CEP-2+10% KT). The results of current study showed egg yolk give the superior effect on maintaining sperm quality (motility, viability and abnormality) after 24 hours in chilled preservation. The motility and viability in CEP-2+Soy Milk groups were significantly ($P<0,01$) lower compared to CEP-2+10% KT extender, but there is no difference ($P>0,05$) on motility percentage between CEP-2+15% SK and CEP-2+10% KT. Furthermore, the abnormality in CEP-2+10% KT was significantly lower than those CEP-2+Soy Milk groups ($P<0,01$). Total motile sperm count was significantly higher ($P<0,01$) in all treatments compared to the standard criteria of SNI 40 million cells/mL. Using soy milk in CEP-2 (*Cauda Epididymal Plasma*) extender can't produce the comparable value on maintaining sperm quality compared to the use of egg yolk as extracellular cryoprotectant during chilled preservation, but CEP-2+15% SK (Soy Milk 15%) had shown decent capability on maintaining sperm motility and total motile sperm count.*

Key Words : CEP-2, soy milk, egg yolk, liquid semen, chilled preservation

PENDAHULUAN

Salah satu usaha untuk meningkatkan kualitas sapi lokal adalah dengan cara teknologi inseminasi buatan (IB) menggunakan sapi yang mempunyai kualitas genetik yang unggul diantaranya

sapi Limousin. Guna terwujudnya peningkatan populasi dan peningkatan mutu genetik sapi maka dilakukan pemanfaatan bioteknologi reproduksi peternakan melalui teknik Inseminasi Buatan (IB) (Ervandi dkk, 2013).

Pengencer CEP-2 adalah salah satu pengencer semen yang dikembangkan oleh Verberckmou *et al.* (2004), mengandung unsur - unsur yang hampir sama sifat fisik dan kimianya dengan plasma semen yang dihasilkan di kauda epididimis. Kendala utama dalam upaya mempertahankan kualitas semen adalah terjadinya kerusakan spermatozoa saat preservasi pada suhu rendah. Salah satu cara mengatasi hal tersebut adalah dengan menambahkan beberapa senyawa ke dalam pengencer, seperti senyawa krioprotektan. Jenis krioprotektan ekstraseluler yang sudah sangat lazim digunakan dalam proses pendinginan (preservasi) semen adalah kuning telur karena mengandung lesitin dan lipoprotein. Penggunaan kuning telur sebagai bahan krioprotektan ekstraseluler sering kali menimbulkan *biohazard* yang disebabkan karena resiko higienitas telur dan berpotensi terkena cemaran mikroorganisme patogen (*xenobiotic contamination*) (Singh *et al.*, 2013). Dilaporkan bahwa bahan pengencer yang menggunakan kuning telur dan susu mengandung bakteri dan *mycoplasma* sebanyak 60 CFU/ml sedangkan yang menggunakan lipoprotein dan lesitin nabati tidak ditemukan adanya mikroorganisme yang membahayakan baik bagi spermatozoa maupun saluran reproduksi betina (Bousseau *et al.*, 1998).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi sari kedelai pada pengencer basal CEP-2 terhadap kualitas semen cair Sapi Limousin selama pendinginan pada suhu rendah.

MATERI DAN METODE

Preparasi Pengencer

Bahan kimia pengencer CEP-2 terdiri dari NaCl 15 mmol/l; KCL 7 mmol/l; $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ 3 mmol/l; $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ 4 mmol/l; NaHCO_3 11,9 mmol/l; NaH_2PO_4 8 mmol/l; KH_2PO_4 20 mmol/l; Fruktosa 55 mmol/l; Sorbitol 1 g/l; BSA (SIGMA) 2 g/l; TRIS (MERCK) 133,7 mmol/l; Gentamicin 0,05 g/l; Asam

Sitrat 42,9 mmol/l. Bahan - bahan dicampur hingga menghasilkan osmolaritas 320 mOsm dan pH 6,6 (Verberckmou, 2004). Sterilisasi media menggunakan membran milipor dengan ukuran pori 0,22 μm . Pengencer CEP-2 ditambahkan kuning telur segar (umur < 3 hari) dengan konsentrasi 10% sebagai kontrol dan ditambahkan berbagai konsentrasi sari kedelai yaitu 7,5%, 10%, 12,5%, 15%.

Koleksi dan Preparasi Semen

Semen segar dikoleksi dari sapi yang terseleksi untuk inseminasi buatan dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang dengan menggunakan vagina buatan, dan selanjutnya diuji kualitasnya meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Semen segar yang digunakan adalah semen yang memiliki persyaratan motilitas individu $\geq 55\%$, motilitas massa minimal 2+, abnormalitas $\leq 20\%$ dan viabilitas $\geq 70\%$.

Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Semen diambil satu tetes menggunakan ose, diletakkan pada kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup suhu dijaga 37 °C dengan menggunakan *slide warmer*. Gerak individu spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali (Garner dan Hafez, 2008).

Pengamatan Viabilitas Spermatozoa

Satu tetes semen diletakkan pada ujung kaca objek. Larutan eosin-negroosin diteteskan satu tetes di dekat semen, keduanya dicampur menggunakan kawat ose kemudian ditutup dengan kaca penutup lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45° dan ditarik ke arah ujung lain sehingga akan menghasilkan preparat ulas yang merata pada seluruh permukaan kaca objek. Preparat tersebut dikering anginkan kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Menghitung spermatozoa yang hidup, yaitu spermatozoa yang tidak berwarna

dan spermatozoa yang mati yaitu spermatozoa yang berwarna merah. Jumlah spermatozoa yang hidup dan mati dihitung minimal 200 spermatozoa (Susilawati, 2011).

Pengamatan Abnormalitas Spermatozoa
Perhitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan terhadap preparat ulas dan dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali. Pengamatan difokuskan pada bagian kepala, leher dan ekor yang abnormal. Pengamatan dilakukan terhadap minimal 200 spermatozoa dan ada lima kategori spermatozoa yang abnormal, yaitu: tidak ada ekor, abnormal kepala, bentuk ekor abnormal dengan adanya *sitoplasmic droplet* pada bagian *proximal* dan bentuk abnormal ekor pada bagian *distal droplet* (Susilawati, 2011).

Analisis Data
Analisis data menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK).

Apabila di antara perlakuan menunjukkan perbedaan pengaruh yang nyata atau sangat nyata, akan dilakukan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*). Pengencer terbaik dari krioprotektan nabati (sari kedelai) dan krioprotektan hewani (kuning telur), selanjutnya diuji menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40%. Total spermatozoa motil diuji menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40 juta spermatozoa motil per milliliter.

HASIL DAN PEMBAHASAN
Pemeriksaan Semen Segar

Semen segar dilakukan pemeriksaan yang meliputi pemeriksaan makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH, sedangkan pemeriksaan secara mikroskopis meliputi motilitas massa, motilitas individu, konsentrasi, viabilitas, abnormalitas. Hasil pemeriksaan semen segar disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan kualitas semen segar sapi limousin

Parameter	Rataan ± SD
Kondisi Umum	
Umur (th)	6,8 ± 0,84
Bobot Badan (kg)	984,4 ± 32,88
Makroskopis	
Volume per ejakulat (ml)	5,56 ± 1,47
Warna	Putih Susu
pH	6,44 ± 0,09
Konsistensi	Sedang
Mikroskopis	
Motilitas Massa	++
Motilitas Individu (%)	58 ± 2,74
Viabilitas (%)	77,71 ± 3,11
Abnormalitas (%)	8,76 ± 2,16
Konsentrasi (Juta/ml)	1004 ± 218,71

Rataan volume semen yang dihasilkan adalah 5,56 ± 1,47 ml, volume semen yang digunakan termasuk dalam kisaran normal. Garner dan Hafez (2008) menyebutkan bahwa volume semen sapi per ejakulasi sebesar 5-8 ml. Warna semen yang

digunakan dalam penelitian adalah putih susu. Semen sapi umumnya mempunyai warna putih susu atau bervariasi sampai warna krem (Partodihardjo, 1992).

Penilaian terhadap motilitas atau daya gerak spermatozoa dibedakan

menjadi motilitas massa dan motilitas individu. Motilitas massa yang didapat adalah ++, sedangkan rataan motilitas individu adalah $58 \pm 2,74\%$, rendahnya motilitas awal disebabkan karena semen yang digunakan adalah semen afkir. Susilawati (2000) menyatakan semen yang mempunyai persentase motilitas di atas 70% lebih tahan hidup dibandingkan bila lebih rendah dari 70%. Rataan konsentrasi semen segar $1004 \pm 218,71$ juta/ml sudah sesuai dengan standar yaitu di atas 1000 juta/ml (Susilawati, 2000).

Persentase Motilitas Spermatozoa

Tabel 2. 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
CEP-2+10% KT	$57,00 \pm 1,97^a$	$55,75 \pm 2,06^a$	$53,50 \pm 2,40^a$	$52,00 \pm 2,84^a$	$43,25 \pm 1,69^a$
CEP-2+7,5% SK	$55,00 \pm 3,12^b$	$51,50 \pm 4,89^b$	$50,25 \pm 4,92^b$	$48,25 \pm 6,13^b$	$22,50 \pm 1,67^e$
CEP-2+10% SK	$56,00 \pm 2,42^{ab}$	$54,25 \pm 1,69^a$	$52,50 \pm 2,04^{ab}$	$49,75 \pm 4,63^b$	$26,25 \pm 2,43^d$
CEP-2+12,5% SK	$56,25 \pm 2,43^{ab}$	$55,00 \pm 1,67^a$	$53,00 \pm 2,30^a$	$50,25 \pm 4,63^{ab}$	$30,25 \pm 1,84^c$
CEP-2+15% SK	$57,00 \pm 1,97^a$	$55,75 \pm 2,06^a$	$53,25 \pm 2,06^a$	$51,50 \pm 3,94^a$	$34,00 \pm 2,42^b$

Keterangan:

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

Fenomena yang terjadi menunjukkan penambahan kuning telur 10% (CEP-2+10% KT) secara signifikan ($P < 0,01$) lebih efektif mempertahankan motilitas spermatozoa hingga jam ke 24 jika dibandingkan dengan penggunaan berbagai konsentrasi sari kedelai (CEP-2+7,5% SK; CEP-2+10% SK; CEP-2+12,5% SK; CEP-2+15% SK), namun hasil uji *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan persentase motilitas sebesar 40% menunjukkan tidak terdapat perbedaan ($P > 0,05$) antara CEP-2+10% KT dan CEP-2+15% SK dalam mempertahankan motilitas spermatozoa selama 24 jam pendinginan. Kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein. Lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran sel spermatozoa dan

Rataan viabilitas spermatozoa adalah $77,71 \pm 3,11\%$, viabilitas semen tersebut termasuk kategori sangat baik karena viabilitas di atas 70% dan masih dianggap baik jika memiliki kisaran nilai antara 50-69% (Lopes, 2002). Rata-rata nilai abnormalitas $8,76 \pm 2,16\%$ masih tergolong baik dan memenuhi kriteria semen yang baik, Garner dan Hafez (2008) menyatakan bahwa abnormalitas spermatozoa tidak boleh melebihi 20%.

berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Yamashiro *et al.*, 2006) dan melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Pangestu, 2002).

Rendahnya kemampuan sari kedelai dalam mempertahankan motilitas spermatozoa dijelaskan oleh Arifiantini, *et al.* (2010) sari kedelai tidak mengandung karbohidrat sedangkan pada kuning telur mengandung karbohidrat 0,6%. Karbohidrat dapat dimetabolisir menjadi energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP). Penurunan motilitas disebabkan oleh semakin sedikitnya spermatozoa yang memiliki cadangan energi yang cukup untuk digunakan bergerak, karena spermatozoa yang telah mengalami cekaman dingin (suhu rendah) dapat mengalami destabilisasi membran (Ihsan, 2008).

Persentase Viabilitas Spermatozoa

Tabel 3. 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
CEP-2+10% KT	78,98 ± 1,44 ^b	77,94 ± 2,22 ^{ab}	77,55 ± 1,99 ^a	77,54 ± 1,84 ^a	72,06 ± 1,41 ^a
CEP-2+7,5% SK	76,07 ± 1,16 ^c	73,48 ± 1,54 ^c	72,74 ± 1,97 ^b	72,40 ± 2,10 ^c	41,43 ± 2,05 ^e
CEP-2+10% SK	79,48 ± 2,97 ^{ab}	76,63 ± 2,29 ^b	76,15 ± 1,85 ^a	75,69 ± 2,58 ^b	49,95 ± 4,06 ^d
CEP-2+12,5% SK	80,18 ± 2,83 ^{ab}	77,04 ± 1,59 ^{ab}	76,48 ± 1,85 ^a	76,08 ± 2,41 ^b	58,70 ± 3,41 ^c
CEP-2+15% SK	81,31 ± 2,79 ^a	78,24 ± 2,30 ^a	77,44 ± 2,24 ^a	76,99 ± 2,34 ^{ab}	63,23 ± 2,99 ^b

Keterangan:

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

Kemampuan sari kedelai pada penelitian ini belum dapat menyamai kuning telur dalam mempertahankan kualitas semen cair yang dipreservasi hingga 24 jam. Konsentrasi sari kedelai hingga 15% dalam pengencer basal CEP-2 (CEP-2+15% SK) memberikan hasil viabilitas spermatozoa yang sangat nyata ($P < 0,01$) lebih rendah daripada CEP-2+10% KT. Kedelai mengandung lipoprotein dalam jumlah besar berupa lesitin kedelai yang mirip dengan lesitin kuning telur yang melindungi membran spermatozoa dari *cold shock*. Pendinginan semen pada suhu 4 °C selama 24 jam menunjukkan bahwa penggunaan Tris kedelai 25% memberikan hasil yang sebanding dengan penggunaan kuning telur 20% dalam mempertahankan kualitas spermatozoa (viabilitas, integritas membran, dan motilitas), namun

penggunaan sari kedelai dengan konsentrasi di atas 30% akan memberikan dampak negatif pada kualitas spermatozoa (Rehman *et al.*, 2014)

Viabilitas spermatozoa tergantung pada keutuhan membran spermatozoa. Kerusakan membran spermatozoa akan menyebabkan terganggunya proses metabolisme intraseluler spermatozoa sehingga spermatozoa akan melemah dan bahkan bisa menyebabkan kematian (Ihsan, 2008). Tingginya persentase viabilitas pada pengencer dengan kuning telur disebabkan karena kandungan lipoprotein dan fosfolipid yang terdapat pada kuning telur mampu melindungi membran plasma spermatozoa karena terjadi peningkatan proporsi kolesterol dan fosfolipid yang melindungi spermatozoa dari *cold shock* (Crespilho *et al.*, 2012).

Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Tabel 4. 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
CEP-2+10% KT	11,76 ± 1,99 ^{ab}	12,48 ± 1,64 ^a	13,06 ± 1,21 ^a	13,73 ± 1,96 ^a	16,24 ± 0,64 ^a
CEP-2+7,5% SK	13,16 ± 2,08 ^b	14,53 ± 1,63 ^b	15,23 ± 1,10 ^b	15,23 ± 1,10 ^b	19,16 ± 0,69 ^b
CEP-2+10% SK	12,43 ± 2,40 ^b	13,60 ± 2,14 ^b	14,26 ± 1,53 ^b	14,73 ± 1,54 ^a	17,11 ± 1,00 ^a
CEP-2+12,5% SK	11,93 ± 2,16 ^{ab}	13,19 ± 2,12 ^{ab}	13,69 ± 1,72 ^{ab}	14,35 ± 1,95 ^a	16,39 ± 0,87 ^a
CEP-2+15% SK	11,38 ± 2,07 ^a	12,83 ± 2,07 ^{ab}	13,06 ± 1,41 ^a	14,04 ± 1,76 ^a	16,13 ± 1,07 ^a

Keterangan:

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

Persentase abnormalitas setelah pendinginan pada suhu 3-5 °C selama 24 jam masih menunjukkan angka di bawah 20% pada CEP-2+10% KT, CEP-2+7,5%

SK, CEP-2+10% SK, CEP-2+12,5% SK dan CEP-2+15% SK, sehingga masih layak digunakan untuk melakukan inseminasi buatan. Spermatozoa yang memiliki

persentase abnormalitas di bawah 20% dan tidak melebihinya, maka semen tersebut masih bisa dipakai untuk inseminasi (Alawiyah dan Hartono, 2006). Pendinginan menyebabkan peningkatan abnormalitas dan kerusakan sel namun masih dapat teratasi dengan adanya

Total Spermatozoa Motil Selama Pendinginan 24 Jam

Peluang terjadinya fertilisasi sangat ditentukan oleh jumlah spermatozoa motil progresif yang ada dalam suatu ejakulat. Suatu ejakulat ataupun semen cair dan semen beku yang digunakan harus memiliki total spermatozoa motil yang

pengencer yang mengandung kuning telur yang didalamnya mengandung lesitin dan lipoprotein dan berfungsi melindungi dalam mempertahankan integritas selubung lipoprotein dari sel dan mencegah cekaman dingin (Ihsan, 2008).

optimal untuk terjadinya fertilisasi. Jumlah spermatozoa motil dapat dihitung dengan mengalikan konsentrasi spermatozoa dengan spermatozoa yang motil progresif (Nikbakht and Saharkhiz, 2011). Rataan hasil penghitungan total spermatozoa motil pada berbagai perlakuan pada jam ke 24 pendinginan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Total spermatozoa motil pada pendinginan jam ke 24

Perlakuan	Total Spermatozoa Motil (juta/ml)
CEP-2+10% KT	76,86 ± 9,66
CEP-2+7,5% SK	41,48 ± 5,72
CEP-2+10% SK	47,68 ± 8,32
CEP-2+12,5% SK	55,19 ± 13,10
CEP-2+15% SK	69,83 ± 11,68
Nilai Harapan	40,00

Analisis menggunakan *Pearson's Chi Square* dengan nilai harapan 40 juta spermatozoa motil menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P < 0,01$) lebih tinggi pada semua perlakuan selama pendinginan 24 jam. Penggunaan berbagai konsentrasi sari kedelai selama pendinginan 24 jam dapat diaplikasikan untuk IB karena menunjukkan hasil yang lebih tinggi dari standar yang ditetapkan oleh SNI yaitu 40 juta/ml spermatozoa motil. Konsentrasi sari kedelai yang optimal pada pengencer CEP-2 dalam mempertahankan total spermatozoa motil terdapat pada CEP-2+15% SK.

KESIMPULAN DAN SARAN

Penggunaan sari kedelai sebagai bahan krioprotektan ekstraseluler belum mampu menggantikan kuning telur dalam pengencer basal CEP-2 (*Cauda Epididymal Plasma*). Namun, penggunaan sari kedelai 15% dapat mempertahankan

persentase motilitas spermatozoa dan total spermatozoa motil hingga jam ke 24.

Penambahan sari kedelai dalam pengencer CEP-2 menunjukkan hasil yang lebih baik pada konsentrasi di atas 10%, sehingga perlu studi lebih lanjut untuk mengetahui level optimum sari kedelai dalam mempertahankan kualitas spermatozoa semen cair.

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.
- Arifiantini, R.I., and T.L. Yusuf. 2010. Developing of tris soy milk diluent for frisian holstein bull frozen semen. *Hayati Journal of Biosciences* 17(2): 91 – 94.

- Bousseau, S., J.P. Brillard, B.M. Le Guine, B. Guine, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin diluents. *Theriogenology* 50: 699 – 706.
- Crespilho, A.M., M.F. Safilho, J.A. Dell'Aqua Jr, M. Nichi, G.A. Monteiro, B.R. Avanzi, A. Martins, and F.O. Papa. 2012. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livestock Science* 149: 1 – 6.
- Ervandi, M., T. Susilawati, dan S. Wahyuningsih. Pengaruh pengencer yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa sapi hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur). *JITV* 18(3): 177 – 184.
- Garner, D.L., and E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction In Farm Animal*. E.S.E. Hafez (editor) 7th Edition. Lea and Febiger: 96-110.
- Ihsan, M.N. 2008. Upaya Peningkatan Konsentrasi Spermatozoa Hasil Pemisahan Dengan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Sapi Friesian Holstein (FH). Disertasi. Program Pascasarjana Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang.
- Lopes, F.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.
- Pangestu, M. 2002. Preservation of spermatozoa: methods and applications. *Reprotech* 1(2): 55 – 66.
- Partodihardjo. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Rehman, F.U., M.S. Qureshi, and R.U. Khan. 2014. Effect of soybean based extenders on sperm parameters of holstein-friesian bull during liquid storage at 4°C. *Pakistan J. Zool* 46(1): 185 – 189.
- Singh, V.K., A.K. Singh, R. Kumar, and S.K. Atreja. 2013. Development of soya milk extender for semen cryopreservation of karan fries (crossbreed cattle). *Cryo Letters*. 34(1): 52 – 61.
- 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. 2011. *Spermatology*. Universitas Brawijaya (UB) Press. Malang. ISBN 978-602-8960-04-5.
- 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 epididimal plasma. *J Reprod Domestic Anim*. 39(6): 1 – 7.
- Yamashiro, H., H. Wang, Y. Yamashita, K. Kumamoto and T. Terada. 2006. Enhanced freezability of goat spermatozoa collected into tubes containing extender supplemented with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Reproduction and Development* 52(3): 407 - 414.