

OVOZOA

Departemen Reproduksi Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan Unair



OVOZOA
Vol. 7, No. 1, April 2018
Terbit tiap 6 bulan, pada Bulan April dan Oktober

Susunan Dewan Redaksi

Ketua Penyunting

Budi Utomo

Sekretaris

Tri Wahyu Suprayogi

Bendahara

Sri Mulyati

Mitra Bestari

Prof. Dr. Ismudiono

Prof. Mas'ud Hariadi, PhD.

Prof. Dr. Imam Mustofa

Prof. Dr. Wurlina

Prof. Dr. Pudji Sianto

Penyunting Pelaksana

Suhermi Susilowati

Sri Pantja Madyawati

Abdul Samik

Herry Agoes Hermadi

Rimayanti

Suzanita Utama

Penyunting Penyelia

Trilas Sardjito

Indah Nourma Triana

Tatik Hernawati

Tjuk Imam Restiadi

Hermin Ratnani

Erma Safitri

Alamat Redaksi: Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115. Telp. 031-5992785 –
5993016; Fax. 031-5993015. E-mail: ovozoa@yahoo.com

OVOZOA

Vol. 7, No. 1, April 2018

Terbit tiap 6 bulan, pada Bulan April dan Oktober

Daftar Isi

	Halaman
1. Efisiensi Reproduksi Sapi Perah Peranakan Friesian Holstein (PFH) Akseptor Inseminasi Buatan (IB) di KUD Sri Wigati Kecamatan Pagerwojo Kabupaten Tulungagung (Atikka Ratna Ningtyas, Budi Utomo, dan Lucia Tri Suwanti) ...	1 - 4
2. Efisiensi Reproduksi Sapi Perah di Kecamatan Cendana Kabupaten Enrekang Sulawesi Selatan (Rana Fitriani Syam, Abdul Samik, dan Djoko Poetranto)	5 - 9
3. Pengaruh Penambahan L-Arginin pada Media Pengencer Skim-Kuning Telur Terhadap Membran Plasma dan Tudung Akrosom Spermatozoa Domba Merino <i>Post Thawing</i> (Abisatul Maghfiroh, Indah Norma Triana, dan Sunaryo Hadi Warsito)	10 - 15
4. Pengaruh Pemberian Beras Merah (<i>Oryza Nivara</i>) Dibandingkan Beras Putih (<i>Oryza sativa</i>) Terhadap Jumlah Anak Dan Bobot Lahir Anak Mencit (<i>Mus musculus</i>) Sekelahiran Yang Hidup (Akbar Ilham Maulana, Hardijanto, dan Suryo Kuncorojakti)	16 - 22
5. Analisis Kadar Kalsium (Ca) dan Fosfor (P) Serum Sapi Perah Penderita Milk Fever di Wilayah Kerja KPSP Setia Kawan Kecamatan Tukur Pasuruan (Mohammad Rizal Zhahriffahmi, Herry Agoes Hermadi, dan Benjamin Chr. Tehupuring)	23 - 26
6. Pengaruh Substitusi Sari Buah Tomat (<i>Lycopersicon esculentum Mill.</i>) pada Media Pengencer Kuning Telur Sitrat Terhadap Motilitas, Viabilitas dan Membran Plasma Uterus Spermatozoa Domba Ekor Gemuk pada Suhu Penyimpanan 3-5°C (Muhammad Zulkhair, Tri Nurhajati, dan Tatik Hernawati)	27 - 32
7. Pengaruh Perbedaan Waktu Inseminasi Buatan Terhadap Angka Kebuntingan Domba Ekor Gemuk yang Disinkronisasi Dengan Prostaglandin F2 α (Dini Ardiningtiar, Sarmanu, dan Budi Utomo)	33 - 36
8. Potensi Ekstrak Etanol Seledri (<i>Apium graveolens</i>) Terhadap Diameter Tubulus Seminiferus dan Jumlah Sel Spermatogenik Mencit (<i>Mus musculus</i>) (Ricky H. Alamsyah, Eka P. Hestianah, Tutik Juniasuti, dan Wurlina)	37 - 41
9. Penambahan Sari Air Laut (Nigarin) Dalam Pengencer Skim Kuning Telur Terhadap Viabilitas dan Motilitas Spermatozoa Sapi Limousin <i>Post Thawing</i> (Mirza Nora Dwijayanti, Trilas Sardjito, dan Endang Suprihati)	42 - 46
10. Efek Pemberian L-Arginine Secara Oral pada Spermatogenesis dan Sel Sertoli Testis Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) (Hening Tyas Pitaloka, Mas'ud Hariadi, dan Nove Hidajati)	47 - 51

	Halaman
11. Efisiensi Reproduksi Sapi Peranakan Ongole (PO) dan Persilangan Limousin-PO (LIMPO) Hasil Inseminasi Buatan di Kecamatan Paciran Kabupaten Lamongan (Febtalia Eka Putri, Sri Mulyati, dan Nunuk Dyah Retno Lastuti)	52 - 57
12. Pengaruh Sari Kulit dan Buah Semangka Merah (<i>Citrullus lanatus</i>) Sebagai Bahan Pengencer Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba (Faisal Andrianto, Suherni Susilowati, dan Kusnoto)	58 - 63
13. Pengaruh Penambahan L-Arginin Dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Merino <i>Post Thawing</i> (Khairun Nisak Afrilia, Tri Wahyu Suprayogi, dan Muchammad Yunus)	64 - 68
14. Efisiensi Reproduksi Sapi Perah Hasil Inseminasi Buatan Di Kecamatan Sanankulon Kabupaten Blitar Pada Tahun 2015 (Jen Riki Fanani, Endang Suprihati, dan Rr. Sri Pantja Madyawati)	69 - 73
15. Efek Protektif Aluminium Silikat Terhadap Kualitas Spermatozoa, Integrasi Membran Plasma Dan Gambaran Histopatologis Tubulus Seminiferus Yang Diinduksi <i>Fusarium Graminearum</i> Pada Mencit Jantan (<i>Mus musculus</i>) (Sondang One Mayosita, Abdul Samik, Ismudiono, dan Budi Utomo)	74 - 78
16. Substitusi Pakan Isi Rumen Sapi Sebagai Alternatif Perbaikan Produktifitas Ternak Itik Mojosari Di Desa Kebonsari Kecamatan Candi Sidoarjo (Tjuk Imam Restiadi dan Thomas V. Widiyatno)	79 - 85

**PENAMBAHAN SARI AIR LAUT (NIGARIN) DALAM PENGECER SKIM
KUNING TELUR TERHADAP VIABILITAS DAN MOTILITAS
SPERMATOZOA SAPI LIMOUSIN *POST THAWING***

**SEAWATER EXTRACT (NIGARIN) ADDITION IN EGG YOLK SKIM
MILK EXTENDER ON VIABILITY AND MOTILITY OF
LIMOUSIN BULL SPERM *POST THAWING***

Mirza Nora Dwijayanti¹⁾, Trilas Sardjito²⁾, Endang Suprihati³⁾,
Student¹⁾, Reproduction Departement²⁾, Parasitology Department³⁾,
Veterinary Medicine Faculty Airlangga University
email : mirzanora94@gmail.com

ABSTRACT

This research was aimed to determine of Seawater Extract (Nigarin) adding effect on viability and motility Limousin bull sperm in *post thawing* examination in skim milk-egg yolk extender. This research used fresh samples of Limousin bull semen collected by using artificial vagina, then divided into 4 treatments. The control treatment (P0), Limousin bull semen with skim milk-egg yolk extender without Seawater Extract (Nigarin) adding. The treatment groups (P1, P2, and P3), Limousin bull semen with skim milk-egg yolk extender + Seawater Extract (Nigarin) 0.109 μ L, 0.426 μ L and 1.09 μ L, respectively. Data analyses using Analysis of Variant (ANOVA) One Way followed with Duncan to determine significant differences between treatments. Result showed that 1.09 μ L Seawater Extract (Nigarin) in skim milk-egg yolk extender is the best concentration to increase viability and motility Limousin bull semen *post thawing* in this research.

Keywords: Limousin bull sperm, egg yolk skim milk extender, Nigarin, motility, viability.

Pendahuluan

Penerapan teknologi inseminasi buatan ditujukan untuk meningkatkan produktivitas sapi, disamping juga memperbaiki genetis sapi, namun akhir-akhir ini pelaksanaan inseminasi buatan sering mengalami kendala, yaitu tingkat keberhasilan inseminasi yang relatif rendah atau menurun dibandingkan dengan beberapa tahun yang lalu. Kondisi yang muncul di lapangan ternyata angka konsepsi yang dihasilkan rendah dan kawin berulang banyak terjadi terutama pada sapi-sapi jenis limousine. Tingkat keberhasilan IB sangat dipengaruhi oleh empat faktor yang saling berhubungan dan tidak dapat dipisahkan satu dengan lainnya yaitu pemilihan sapi akseptor, pengujian kualitas semen, akurasi deteksi birahi oleh para peternak dan ketrampilan inseminator. Dalam hal ini inseminator dan peternak merupakan ujung tombak pelaksanaan IB sekaligus sebagai pihak yang bertanggung jawab terhadap berhasil atau tidaknya program IB di lapangan (Hastuti, 2008).

Permasalahan di lapangan yang masih sering terjadi yaitu kawin berulang, akan berpengaruh terhadap tingkat keberhasilan kebuntingan dan jarak beranak. Kawin berulang adalah suatu keadaan sapi betina yang mengalami kegagalan untuk bunting setelah dikawinkan 3 kali atau lebih dengan pejantan fertil tanpa adanya abnormalitas yang teramati. Terjadinya kawin berulang pada umumnya dapat disebabkan karena kegagalan fertilisasi dan kematian embrio dini. Kegagalan fertilisasi bisa disebabkan waktu thawing yang tidak sesuai sehingga terjadi penurunan kualitas spermatozoa. Hasil survey eksistensi IB menunjukkan perlu dilakukan perbaikan terhadap infrastruktur IB yaitu dalam pengolahan dan pelaksanaan IB oleh inseminator. Untuk itu diperlukan bahan yang dapat mempertahankan kualitas semen beku ini terutama motilitas spermatozoa ke dalam pengencer yang sudah ada, karena pada dasarnya hanya sperma motil mempunyai peluang besar untuk membuahi sel telur (Pratiwi dkk., 2006; Nurhayati dkk., 2008).

Pengencer yang digunakan adalah susu skim (bersifat *buffer*) kuning telur. *Buffer* berfungsi sebagai pengatur tekanan osmotik dan juga berfungsi menetralkan asam laktat yang dihasilkan dari sisa metabolisme, sehingga *buffer* diharapkan mempunyai kemampuan sebagai penyangga yang baik dengan toksisitas yang rendah dalam konsentrasi yang tinggi. Kuning telur umumnya ditambahkan ke dalam pengencer semen sebagai sumber energi, agen protektif dan dapat memberikan efek sebagai penyangga terhadap spermatozoa. Kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin (*cold shock*). Kuning telur juga mengandung glukosa, vitamin yang larut dalam air dan larut dalam lemak sehingga menguntungkan bagi spermatozoa (Permatasari dkk, 2013).

Sari Air Laut (Nigarin) merupakan air sisa mineral dari air laut yang dipisahkan dengan bantuan sinar matahari. Proses pembuatan garam dengan cara penguapan dengan sinar matahari dapat menghasilkan nigarin (Sarwono dan Saragih, 2003). Sari air laut diproses dari air tua. Air tua merupakan lapisan air paling atas dalam pembuatan garam. Untuk bisa menjadi sari air laut, air tua diproses lebih lanjut dengan otoklaf kristalisasi (Duryatmo, 2006). Menurut Levine (2002) Sari Air Laut (Nigarin) banyak mengandung magnesium 6%, kalium 1,5-2%, dan dapat dimanfaatkan sebagai pencegah penyakit. Menurut Gum (2004), magnesium sangat diperlukan untuk metabolisme energi, penggunaan glukosa, sintesis protein, sintesis dan pemecahan asam lemak, seluruh fungsi ATPase, hampir seluruh reaksi hormonal dan menjaga keseimbangan ionik seluler. Magnesium akan merangsang enzim adenilat siklase yang berfungsi mengkatalis cAMP yang akan memodulasi pergerakan sperma. Manfaat magnesium tersebut sangat berpengaruh untuk kelangsungan hidup sperma selama proses pembekuan.

Berdasarkan latar belakang di atas penulis meneliti pengaruh penambahan Sari Air Laut (Nigarin) berbagai konsentrasi dalam pengencer skim kuning telur pada semen sapi Limousin *post thawing* untuk dapat memperpanjang kehidupan spermatozoa.

Metode Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah semen sapi Limousin yang ada di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Semen diambil setiap dua kali dalam seminggu dan ditampung menggunakan vagina buatan. Setelah pengambilan semen, dilanjutkan dengan pemeriksaan makroskopis dan pemeriksaan mikroskopis. Pemeriksaan motilitas spermatozoa *post thawing* diperiksa dengan cara menempatkan satu tetes semen yang telah diencerkan pada gelas objek yang ditutup dengan gelas penutup dan diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 atau 400 kali. Pemeriksaan viabilitas spermatozoa *post thawing* Jumlah spermatozoa yang hidup dihitung dengan cara meneteskan semen yang telah diencerkan pada objek glass yang bersih lalu dicampur dengan zat warna *eosin negrosin* kemudian dibuat preparat ulas dengan cara slide dan kemudian difiksasi diatas api ± 15 detik. Pengamatan dilakukan atas spermatozoa yang hidup dan mati pada satu lapangan pandang kemudian dilakukan perhitungan atas 100 spermatozoa dengan perbesaran 400 kali.

Data yang diperoleh disusun dalam satu tabel, selanjutnya untuk mengetahui perbedaan motilitas dan viabilitas dianalisis dengan menggunakan Analysis of Variant (ANOVA) One Way kemudian dilanjutkan dengan uji jarak Duncan untuk mengetahui perbedaan yang nyata antar perlakuan (Kusriningrum, 2008).

Hasil dan Pembahasan

Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar sapi Limousin dilakukan untuk mengetahui kualitas dan kuantitas semen domba yang akan diproses menjadi semen beku. Hasil pemeriksaan semen segar sapi Limousin dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil pemeriksaan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin *post-thawing* setelah diberi perlakuan penambahan Sari Air Laut (Nigarin) dalam pengencer skim kuning telur dengan berbagai konsentrasi yaitu : kontrol (P0), 0,109 μ L (P1), 0,426 μ L (P2) dan 1,09 μ L (P3) dapat dilihat dalam tabel 2.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis dan mikroskopis Spermatozoa sapi Limousin.

N	Vol (ml)	Konsistensi	Bau	Warna	pH	Konsentrasi (juta/ml)	GM	GI/Kecepatan
1	6	Kental	Khas	Putih	6-7	1617	+++	80/3
2	5	Kental	Khas	Putih	6-7	1213	+++	80/3
3	9,6	Sedang	Khas	Putih	6-7	708	++	80/3
4	8,5	Sedang	Khas	Putih	6-7	876	++	80/3
5	8,5	Sedang	Khas	Putih	6-7	981	++	80/3
6	5	Kental	Khas	Putih	6-7	1214	+++	80/3

Keterangan : n (Ulangan), Vol (Volume), GM (Gerakan massa), GI (Gerakan individu).

Tabel 2. Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa sapi Limousin *Post Thawing*

Perlakuan	Ulangan (n)	Motilitas Spermatozoa (%) (rerata ± standar deviasi)	Viabilitas Spermatozoa (%) (rerata ± standar deviasi)
P0	6	33,33 ^a ± 8,164	39,33 ^a ± 7,941
P1	6	35,83 ^a ± 6,645	42,67 ^a ± 6,408
P2	6	40,83 ^{ab} ± 9,174	47,17 ^{ab} ± 8,256
P3	6	47,50 ^b ± 9,874	53,83 ^b ± 9,046

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

Pemeriksaan motilitas dan viabilitas spermatozoa merupakan peranan sangat penting terhadap penentuan kualitas semen sesudah pengenceran dan merupakan salah satu indikator yang penting untuk meningkatkan fertilisasi Daya gerak spermatozoa *progresif* menjadi suatu patokan yang masuk kedalam hitungan. Sedangkan viabilitas spermatozoa adalah menghitung jumlah spermatozoa yang hidup dan mati.

Motilitas (pergerakan) spermatozoa terjadi karena adanya selubung mitokondria pada bagian tengah ekor spermatozoa yang berperan sebagai tempat sintesis energi untuk pergerakan (Feradis, 2010). Pergerakan ekor spermatozoa bergantung pada produksi ATP oleh mitokondria dengan sumber energi metabolisme (Sonjaya, 2012). Pada suhu rendah metabolisme spermatozoa akan berlangsung secara perlahan sehingga dapat menghemat penggunaan sumber energi (Susilawati, 2011; Vishwanath and Shannon, 2000). Akibat dari metabolisme yang terus berlangsung menyebabkan ketersediaan nutrisi akan semakin menipis, sedangkan konsentrasi spermatozoa semen segar sangat tinggi. Jumlah spermatozoa yang banyak akan mempercepat penggunaan nutrisi untuk keperluan metabolisme spermatozoa, sehingga nutrisi akan cepat habis dan produksi ATP di mitokondria akan terhambat sehingga dapat

mempengaruhi motilitas spermatozoa (Fiqri dkk., 2014).

Penambahan Sari Air Laut (Nigarin) ke dalam pengencer skim kuning telur menyebabkan spermatozoa tetap bergerak. Sari Air Laut mengandung magnesium, salah satu fungsi magnesium yang paling utama adalah sebagai kofaktor dalam produksi energi. Spermatozoa membutuhkan magnesium untuk mengaktifkan ATP (*adenosine triphosphate*), yang merupakan sumber energi utama yang digunakan spermatozoa untuk bergerak (Hartwig, 2001). Energi untuk motilitas spermatozoa berasal dari perombakan ATP di luar mitokondria yaitu sitosol melalui reaksi-reaksi penguraiannya menjadi adenosine diphosphat (ADP) dan adenosine monophosphat (AMP) (Hardijanto dkk., 2010). Pada saat pembekuan spermatozoa disimpan dalam keadaan anaerobik, sehingga spermatozoa memakai karbohidrat yang terdapat pada bahan pengencer sebagai sumber energi. Energi dalam bentuk ATP dihasilkan dengan metabolisme karbohidrat terutama pada jalur glikolisis. Glikolisis yang berlangsung secara anaerob akan menghasilkan 2 mol ATP dan membentuk asam laktat. Mg^{2+} dibutuhkan dalam reaksi glikolisis anaerobik sebagai kofaktor enzim heksokinase untuk reaksi fosforilasi glukosa oleh ATP menjadi glukosa 6-p (Murray et al., 2003).

Metabolisme karbohidrat yang berjalan cepat dan terus menerus pada saat penyimpanan akan menyebabkan kadar glukosa dalam sel semakin rendah. Rendahnya kadar glukosa pada spermatozoa akan membentuk siklik AMP. Magnesium yang terdapat pada Sari Air Laut (Nigarin) merupakan stimulator kuat aktivitas dari *messenger system* seperti enzim adenilat siklase yang berfungsi mengkatalis pembentukan cAMP (Lapointe dkk., 1996). Cyclic AMP merupakan *second messenger* yang dibentuk dari senyawa ATP oleh kerja enzim Adenilat siklase dengan adanya Mg^{2+} yang membentuk suatu kompleks dengan ATP untuk bertindak sebagai substrat untuk reaksi (Murray *et al.*, 2000). Peningkatan konsentrasi cAMP ini selanjutnya dapat memfosforilasi enzim protein kinase A (PKA) dan juga protein tirosin kinase (PTK). Fosforilasi enzim-enzim tersebut selanjutnya mengaktivasi tirosin kinase yang ada dalam bagian ekor spermatozoa sebagai biokatalisator dalam proses fosforilasi tirosin. Produk fosforilasi tersebut memodulasi pergerakan spermatozoa dan diikuti dengan terjadinya kapasitasasi (Inaba, 2003).

Menurut Pramono dan Taswin (2008), bertambahnya energi berupa ATP pada spermatozoa akan meningkatkan angka viabilitas. ATP tersebut digunakan oleh spermatozoa sebagai energi untuk bertahan hidup selama proses pembekuan. Selain itu pada penelitian ini menggunakan pengencer skim kuning telur. Kuning telur mengandung lesitin untuk melindungi spermatozoa terhadap cekaman dingin selama proses pembekuan. Permatasari dkk. (2013) menyatakan bahwa fungsi kuning telur terletak pada kandungan lipoprotein dan lesitinnya yang dapat bekerja mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel sperma terutama selama proses pembekuan dan pencairan kembali. Lipoprotein akan melindungi sperma dari luar sel yaitu dengan jalan meletakkan diri pada membrane plasma sperma sehingga sperma terbungkus oleh lipoprotein. lipoprotein adalah komponen utama di dalam kuning telur yang mempunyai daya tarik menarik dengan membrane plasma sperma.

Penambahan Sari Air Laut (nigarin) P1 0,109 μ L menunjukkan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa masih rendah

dibandingkan dengan P2 0,426 μ L tetapi sudah lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan pembentukan energi oleh Sari Air Laut (Nigarin) pada P1 sudah terjadi tetapi masih sedikit karena tidak terlihat perbedaan nyata dengan kontrol. Pada perlakuan P2 0,426 μ L pada spermatozoa hanya sebagian dalam menghasilkan energi, sehingga masih belum terlihat perbedaan yang nyata bila dibandingkan dengan kontrol. Sedangkan perlakuan yang menghasilkan cukup banyak energi dan meningkatkan motilitas dan viabilitas adalah pada P3 1,09 μ L dengan menghasilkan ATP melalui proses metabolisme. Menurut Lapointe *et al.* (1996) juga menunjukkan bahwa penambahan Magnesium dengan konsentrasi 5 mM mampu meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa Penambahan Air Laut (Nigarin) 1,09 μ L ke dalam pengencer skim kuning telur dapat meningkatkan motilitas dan viabilitas spermatozoa sapi Limousin *post thawing*.

Daftar Pustaka

- Duryatmo, S. 2006. Kisah Obat dari Ladang garam. Trubus 444: 112-113.
- Feradis, 2010. Bioteknologi Reproduksi pada Ternak. Alfabeta. Bandung.
- Fiqri, M.M., N. Ducha, dan Raharjo. 2014. Motilitas Spermatozoa Sapi Brahman dengan Berbagai Konsentrasi dalam Pengencer CEP-D yang Disimpan dalam Refrigerator. Lentera Bio 3(3): 181-185.
- Gums, J.G. 2004. Magnesium in Cardiovascular and Other Disorders. Am J Health-Syst Pharm. 61: 1569-76.
- Hartwig, A. 2001. Role of Magnesium in Genomic Stability. Mutat Res. 475(1-2): 113-21.
- Hastuti, D. 2008. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan Sapi Potong di Tinjau dari Angka Konsepsi dan Service Per Conception. Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian. 4: 12-20.
- Inaba, K. 2003. Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. Zoolog Sci; 20: 1043-56.

- Kusriningrum, R.S. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. 84-86.
- Lapointe, S., Ahmad, M.M. Bhur, dan M.A. Sirard. 1996. Modulation of Post-thaw Motility, Survival, Calcium Uptake, and Fertility of Bovine Sperm by Magnesium and Manganese. *Journal Dairy Science* 79: 2163-2169
- Levine, Ira N. 2002. Physical Chemistry. Fifth edition. The McGraw-Hill Companies Inc. USA.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell. 2000. Harper's Biochemistry 25thed. Appleton and Lange. America. 534-626.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, and V.W. Rodwell. 2003. Harper's illustrated Biochemistry 26thed. International Edition. The Mc Graw Hills Companies . 534-626.
- Naz, R.K. and B.R., Preeti. 2004. Role of Tyrosine Phosphorylation in Sperm Capacitation /Acrosome Eraction. *Reprod. Biol. Endo.* 2: 1-12.
- Nurhayati, I.S., R.A. Saptati dan E.Martindah. 2008. Penanganan Gangguan Reproduksi Guna Mendukung Pengembangan Usaha Sapi Perah. *Prosiding Prospek Industri Sapi Perah Menuju Perdagangan Bebas 2020*.
- Permatasari, W.D., A.T. Setiatin, dan D. Samsudewa. 2013. Studi Tentang Pengencer Kuning Telur dan Pengaruhnya Terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Jawa Brebes. *Animal Agriculture Journal.* 2 (1): 143-151.
- Pramono, E., dan Taswin R. 2008. Pengaruh Penambahan Adenosin Triphosphat ke dalam Pengencer Semen terhadap Kualitas Spermatozoa Domba Ekor Gemuk. *Animal Production.* 10 (3): 151-156.
- Pratiwi, W.C., L. Affandhy, dan D. Ratnawati. 2006. Pengaruh Lama *Thawing* terhadap Kualitas Semen Beku Sapi Limosin dan Brahman. *Animal Production* (1). Hal 48-52.
- Sarwono, S. dan Y.P. Saragih. 2003. *Membuat Aneka Tahu*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Sonjaya, H. 2012. *Dasar Fisiologi Ternak*. Bogor: IPB Press.
- Susilawati, T. 2011. *Spermatologi*. Universitas Brawijaya Press, Malang
- Vishwanath, R, and P. Shanon, 2000. Storage of Bovine Semen in Liquid and Ffrozen State". *Animal reproduction science* 62 (2000): 23-53