

## **Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Cemani dalam Pengencer Susu Skim Fosfat pada Penyimpanan Suhu Ruang**

*(MOTILITY AND VIABILITY SPERMATOZOA OF CEMANI ROOSTER  
IN PHOSPHATE SKIM MILK EXTENDER STORED AT ROOM TEMPERATURE)*

**I Wayan Gede Aerawata<sup>1</sup>,  
Wayan Bebas<sup>2</sup>, Tjok Gde Oka Pemayun<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan,

<sup>2</sup>Laboratorium Reproduksi dan Kemajiran Veteriner,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana  
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234

Telp/Fax: (0361) 223791

E-mail: [aerawata.ops@gmail.com](mailto:aerawata.ops@gmail.com)

### **ABSTRAK**

Ayam cemani merupakan unggas asli Indonesia yang berasal dari wilayah Kedu, Temanggung, Jawa Tengah. Ayam cemani mempunyai populasi dan produksi yang rendah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan semen terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani dengan pengencer susu skim fosfat yang disimpan pada suhu ruang atau 29°C. Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tujuh perlakuan dan lama waktu penyimpanan spermatozoa sebagai berikut: T0 = penyimpanan selama 0 menit; T1 = penyimpanan selama 30 menit; T2 = penyimpanan selama 60 menit; T3 = penyimpanan selama 90 menit; T4 = penyimpanan selama 120 menit; T5 = penyimpanan selama 150 menit; T6 = penyimpanan selama 180 menit. Masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Parameter yang diamati adalah motilitas progresif (%) dan daya hidup spermatozoa (%) selama 180 menit. Hasil penelitian menunjukkan penyimpanan semen ayam cemani dengan menggunakan pengencer susu skim fosfat mampu mempertahankan kualitas spermatozoa dengan waktu penyimpanan hingga 150 menit dengan motilitas progresif mencapai 41,75±1,70% dan daya hidup 47,5±1,29%. Simpulan dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penyimpanan semen ayam cemani menggunakan pengencer susu skim fosfat pada suhu 29°C layak digunakan untuk IB hingga 150 menit waktu penyimpanan.

Kata-kunci: daya hidup; motilitas; semen ayam cemani; suhu ruang 29°C; susu skim fosfat

### **ABSTRACT**

Cemani chicken is an Indonesia origin poultry, and well developed in Kedu region, Temanggung, Central Java. The population and production of Cemani chickens are low. This research aims to determine the effect of semen storage on motility and viability of Cemani rooster spermatozoa with skimmed phosphate milk as a thinners, stored at 29°C a room temperature. The completely randomized design was used in this research. There were seven groups of treatment storage time e.g. T0= storage for 0 minutes, T1= storage for 30 minutes, T2= storage for 60 minutes, T3= storage for 90 minutes, T4= storage for 120 minutes, T5= storage for 150 minutes, T6= storage for 180 minutes. Each group repeated four times. The parameters observed progressive motility (%), and viability (%) for 180 minutes. The result of this study showed that storage of Cemani rooster semen using skim milk phosphate diluent was able to maintain the quality of spermatozoa for 150 minutes storage with 41.75%±1.70% progressive motility and 41.5%±1,29% for viability. The conclusion from the results of this research shows that: the storage of Cemani rooster semen using skim milk phosphate as diluent at 29°C is suitable for 150 minutes of storage. The conclusion shows that the storage of Cemani rooster semen using skim phosphate milk as diluent, storage at 29 ° C is suitable for artificial insemination using up to 150 minutes.

Keywords: viability; motility; Cemani rooster semen; 29°C room temperature; phosphate skimmed milk

## PENDAHULUAN

Indonesia memiliki keanekaragaman fauna dunia termasuk ayam lokal. Ayam lokal merupakan unggas andalan yang mempunyai potensi tinggi dalam memenuhi ketersediaan pangan asal hewan dalam bentuk daging dan telur ayam (Samariyanto, 2010). Peran ayam lokal terutama ayam kampung dalam ekonomi masyarakat masih cukup tinggi, terutama di daerah pedesaan (Iskandar, 2006).

Ayam cemani merupakan ayam endemik Indonesia yang terdapat di Wilayah Kedu, Temanggung, Jawa Tengah (Budipitojo *et al.*, 2017). Perbedaan ayam cemani dan ayam kedu hitam terdapat pada sebaran warna hitamnya. Warna hitam pada ayam cemani menyebar keseluruh bagian tubuh, sedangkan pada ayam kedu hitam, bagian tertentu seperti kulit paha atas dan pial berwarna kemerahan. Ayam cemani mempunyai populasi dan produksi yang rendah sehingga menghambat perkembangannya. Untuk meningkatkan produksi dan kualitas ayam cemani diperlukan teknologi reproduksi di antaranya adalah teknologi Inseminasi Buatan/IB (Danang, 2012).

Inseminasi buatan pada ayam merupakan suatu proses memasukkan semen kedalam saluran reproduksi ayam betina dengan bantuan manusia. Keuntungan yang diperoleh dengan melaksanakan IB: (1) efisiensi penggunaan pejantan unggul, (2) menghemat biaya pemeliharaan, (3) pejantan yang digunakan telah melalui seleksi secara teliti, (4) mencegah penularan penyakit, dan (5) meningkatkan efisiensi reproduksi (Toelihere, 1993). Inseminasi buatan dilakukan untuk mengatasi rendahnya fertilitas karena sifat memilih pasangan yang tinggi pada ayam. Dalam menunjang teknologi IB diperlukan semen dengan kualitas baik, adapun faktor yang berperan dalam menentukan kualitas semen antara lain: kadar pengencer, sifat-sifat fisik dan kimia bahan pengencer (pH, tekanan osmosis, elektrolit yang terkandung), suhu, dan lama penyimpanan (Toelihere, 1993; Priscilla *et al.*, 2016). Dalam IB penyimpanan semen segar hanya mampu bertahan kurang dari dua jam, semen ayam mempunyai konsentrasi yang tinggi dengan volume yang sedikit, untuk mempertahankan kualitas semen dan mengefisienkan semen maka diperlukan pengenceran dengan bahan pengencer yang baik (Toelihere, 1993).

Beberapa bahan pengencer yang dapat digunakan untuk menunjang lama simpan semen yaitu susu skim, kuning telur dan air kelapa. Menurut Masruro (2016), susu skim mempunyai harga relatif murah dan mudah didapat. Susu skim adalah produk susu yang dibuat dengan cara menghilangkan lemak dan disterilkan dengan proses (*Ultra High Temperature*), tanpa harus menghilangkan kandungan gizi lain yang terdapat dalam susu, seperti laktosa, protein, mineral,

vitamin dan air. Menurut Suryaningsih *et al.* (2015), susu skim mengandung protein sebesar 37,4% dan lemak sebesar 0,5%. Sifat fisik susu mempunyai pH 6,5–7,5 susu skim hanya menyediakan zat-zat energi bagi spermatozoa, sehingga perlu ditambahkan dengan bahan lain sebagai penyangga (Utomo dan Sumaryati, 2001). Penyangga yang dapat digunakan di antaranya yaitu *Phosphate Buffered Saline* (PBS), penyangga ini mampu membantu sel dalam mempertahankan konsistensi pH, mempunyai kemampuan dalam mempertahankan osmolaritas serta PBS bersifat isotonik dan tidak beracun untuk sebagian besar sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyimpanan semen terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani dengan pengencer susu skim fosfat yang disimpan pada suhu ruang (29°C).

### METODE PENELITIAN

Objek penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah dua ekor ayam cemani jantan berumur sekitar 6-8 bulan sebagai sumber semen. Hewan coba diadaptasikan dengan lingkungan dan operator (penampung semen) selama satu minggu. Pada tahap ini ayam cemani jantan dilatih untuk mengeluarkan semen dengan metode pemijatan. Semen dari kedua pejantan dikumpulkan kemudian dihomogenkan dan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH, dan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, konsentrasi, jumlah spermatozoa hidup dan abnormalitas. Setelah kualitas semen diketahui, kemudian spermatozoa diencerkan dengan pengencer susu skim fosfat.

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan tujuh perlakuan, lama waktu penyimpanan sebagai perlakuan masing masing: T0 = 0 menit penyimpanan; T1 = penyimpanan selama 30 menit; T2 = penyimpanan selama 60 menit; T3 = penyimpanan selama 90 menit; T4 = penyimpanan selama 120 menit; T5 = penyimpanan selama 150 menit; T6 = penyimpanan selama 180 menit. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Parameter yang diamati adalah motilitas (%), dan daya hidup spermatozoa (%) selama 180 menit. Jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu  $(t-1)(n-1) \geq 15$ , dalam hal ini t adalah jumlah perlakuan dan n adalah banyaknya ulangan tiap perlakuan. Penelitian ini menggunakan tujuh perlakuan sehingga diperoleh perhitungan  $(7-1)(4-1) \geq 15$  adalah 18. Sehingga jumlah sampel yang digunakan adalah 18 sampel. Tahapan pertama yaitu pengujian homogenitas dengan menggunakan *shapiro-Wilk Test* dan uji normalitas dengan *Levene's Test* jika hasil dari pengujian menunjukkan data homogen

berdistribusi normal dan hasil analisisnya menunjukkan perbedaan yang bermakna maka perlu dilanjutkan dengan uji Duncan.

### **Adaptasi Hewan Coba**

Ayam cemani diadaptasikan dengan lingkungan dan operator (penampung semen) selama satu minggu. Pada tahap ini ayam dilatih untuk mengeluarkan semen dengan metode pemijatan.

### **Teknik Penampungan Semen**

Metode penampungan semen yang digunakan pada ayam yaitu dengan metode pemijatan (*massage*), yaitu melakukan pengurutan pada bagian punggung ayam ke arah belakang hingga ujung kaudal. Pemijatan ujung kaudal tersebut harus dilakukan secara cepat dan menerus dengan tekanan tertentu sampai terjadi ereksi yang ditandai dengan keluarnya papila dari kloaka dan kaki yang meregang. Pejantan dipijat secara ritmik dengan jari tangan hingga ejakulasi terjadi dan efek ejakulatoris berhenti, kemudian sperma yang keluar ditampung dan dijaga agar tidak terkontaminasi dari kotoran (Toelihere, 1993).

### **Pembuatan Pengencer Susu Skim Fosfat**

Pengencer dibuat dengan melarutkan satu tablet buffer fosfat ke dalam 100 mL aquadestilata, dilakukan dengan pasteurisasi di atas kompor listrik selama 10 menit sambil diaduk kemudian didinginkan. Pengencer susu skim fosfat dibuat dengan konsentrasi 10%, Setelah dingin larutan PBS sebanyak 90 mL, dicampurkan dengan 10 mL susu skim. Tambahkan antibiotik penicillin dan streptomycin masing-masing 0,1 mg/mL pengencer, lalu homogenkan. Produk susu yang saya gunakan dalam penelitian ini adalah susu skim (*Green Fields Skimmed Milk*<sup>®</sup>. Greenfield Dairy, Malang, Indonesia).

### **Evaluasi Semen**

Ejakulat dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis. Evaluasi semen secara makroskopis meliputi volume, warna, konsistensi, dan pH. Pemeriksaan secara mikroskopis meliputi gerakan massa, motilitas, persentase spermatozoa hidup, abnormalitas, konsentrasi dan jumlah spermatozoa per ejakulat. Teknik evaluasi ini mengadopsi dari Saili dan Toelihere (2005).

### **Pengamatan Motilitas Spermatozoa**

Pengamatan motilitas spermatozoa dilakukan dengan meneteskan 2  $\mu$ L semen di atas gelas objek kemudian diteteskan satu tetes NaCl fisiologis. Larutan dihomogenkan dan ditutup

dengan gelas penutup. Preparat diamati di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Motilitas spermatozoa dinilai secara estimasi dari 5-10 lapangan pandang dengan cara membandingkan jumlah spermatozoa yang bergerak maju ke depan dengan gerakan spermatozoa yang lain, nilai dinyatakan dalam persen (Toelihere, 1993).

### **Pengamatan Daya Hidup Spermatozoa**

Penentuan persentase hidup spermatozoa dilakukan dengan metode pewarnaan eosin nigrosin. Satu tetes semen yang telah diencerkan, diletakkan pada gelas objek kemudian ditambah dengan cairan pewarna eosin nigrosin lalu dihomogenkan. Selanjutnya dibuat preparat ulas dengan cara menekan dan mendorong dengan menggunakan gelas objek membentuk sudut 45° dan dikeringkan, kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang mati menyerap zat warna merah karena permeabilitas dinding selnya telah melemah atau rusak (Toelihere, 1993).

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji sidik ragam dengan aplikasi SPSS. Perbedaan yang bermakna antar perlakuan dilanjutkan menggunakan uji jarak berganda Duncan. Penelitian dilakukan di Laboratorium Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana pada bulan Mei 2020.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Dua ekor ayam cemani jantan ditampung semen segarnya, lalu dihomogenkan kemudian dilakukan pemeriksaan, hasil pemeriksaan semen segar secara makroskopis dan mikroskopis diperoleh data seperti disajikan pada Tabel 1.

Penampungan semen segar hasil dari dua ekor ayam cemani yang layak digunakan untuk IB dengan jumlah 1 mL, masing-masing ayam mendapatkan 0,5 mL semen untuk sekali ejakulat volume rerata semen unggas sekali ejakulat sekitar 0,25 mL. Individu berbeda dalam jenis ayam yang sama dapat menghasilkan volume semen yang berbeda. Menurut Garner dan Hafez (1987) volume ejakulat unggas yaitu antara 0,2-0,5 mL. Secara umum semen ayam memiliki volume yang rendah tetapi memiliki konsentrasi spermatozoa yang tinggi (Malik *et al.*, 2013), sedangkan semen yang didapatkan mempunyai konsistensi yang kental dan bau yang spesifik. Semen ini sudah sesuai dengan pernyataan Johari *et al.* (2009), yang menyatakan bahwa kualitas semen yang baik seharusnya kental dan berwarna putih krem dengan bau yang spesifik (amis). Semen ayam berwarna putih bersih dengan konsistensi kental dan hanya sebagian kecil bening dengan konsistensi encer (Sopiyana *et al.*, 2006). Selanjutnya pH yang didapatkan pada

penelitian ini (Tabel 1) berkisar antara 7,4 ini sudah sesuai dengan pernyataan Garner dan Havez (1987), menurut mereka pH semen unggas adalah sedikit basa dengan kisaran 7,2-7,8. Pemeriksaan pH menggunakan pH meter dan pH semen ayam pejantan dipengaruhi oleh asam laktat yang dihasilkan dari proses metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerobik. Penimbunan asam laktat dapat meningkatkan atau menurunkan pH larutan tersebut (Toelihere, 1993).

Tabel 1. Gambaran makroskopis dan mikroskopis semen segar ayam cemani

Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
<b>Makroskopis</b>	
Volume (mL)	0,5
Warna	Putih Krem
pH	7,4
Konsistensi	Kental
Bau	Spesifik
<b>Mikroskopis</b>	
Gerakan massa	+++
Motilitas Progresif (%)	85
Konsentrasi ( $10^6$ )	5027
Sperma Hidup (%)	94
Abnormalitas (%)	4

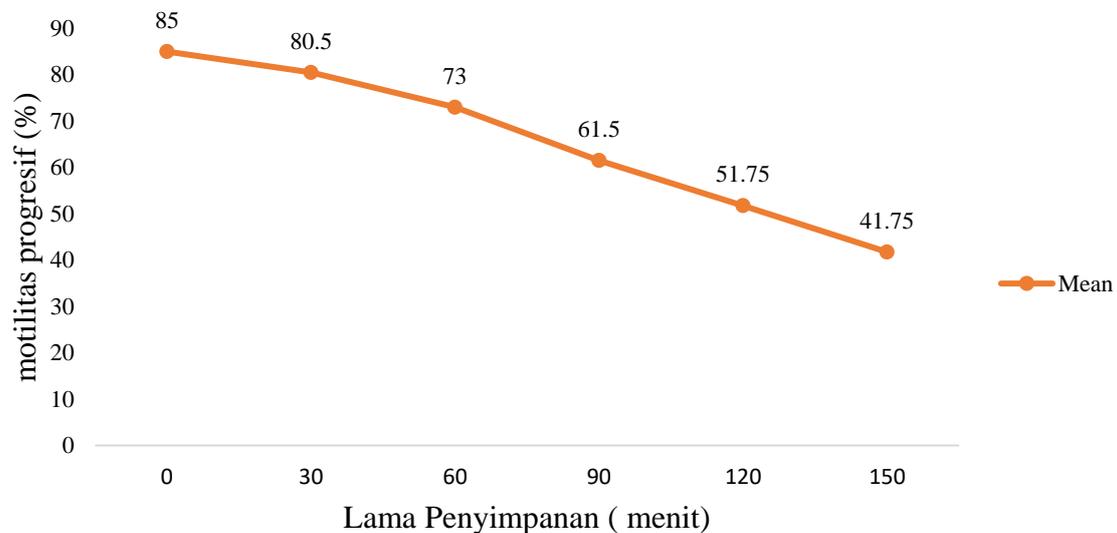
Semen ayam cemani yang digunakan pada penelitian ini dinyatakan layak digunakan karena hasil dari evaluasi secara mikroskopis (Tabel 1) didapatkan, gerakan massa (+++). Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, semen akan mempunyai kualitas yang semakin baik (Junaedi *et al.*, 2016). Motilitas progresif 85%, daya hidup 94% dan abnormal sebesar 4%, data ini sudah sesuai dengan pernyataan dari Solihati *et al.* (2006) bahwa motilitas individu di atas 40% layak digunakan untuk IB dan semen yang layak digunakan untuk teknologi IB adalah memenuhi syarat persentase daya hidup diatas 45% (Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999). Menurut Solihati, (2006) motilitas terendah yang layak digunakan untuk IB adalah 40%. Dalam penelitian ini penyimpanan semen ayam cemani yang layak digunakan untuk IB adalah sampai menit ke-150, persentase rataan motilitas terendah yang ditunjukkan adalah pada menit ke-150 yaitu 41,75%. Dari hasil pengamatan ditunjukkan terjadi penurunan persentase motilitas dari menit ke-0 sampai menit ke-150. Solihati *et al.* (2006) menyatakan bahwa spermatozoa tetap melakukan aktivitas pergerakan dan metabolisme yang menyebabkan persediaan energi semakin berkurang selama penyimpanan.

Tabel 2. Rerata motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam cemani pada pengencer susu skim fosfat yang disimpan pada suhu 29 °C

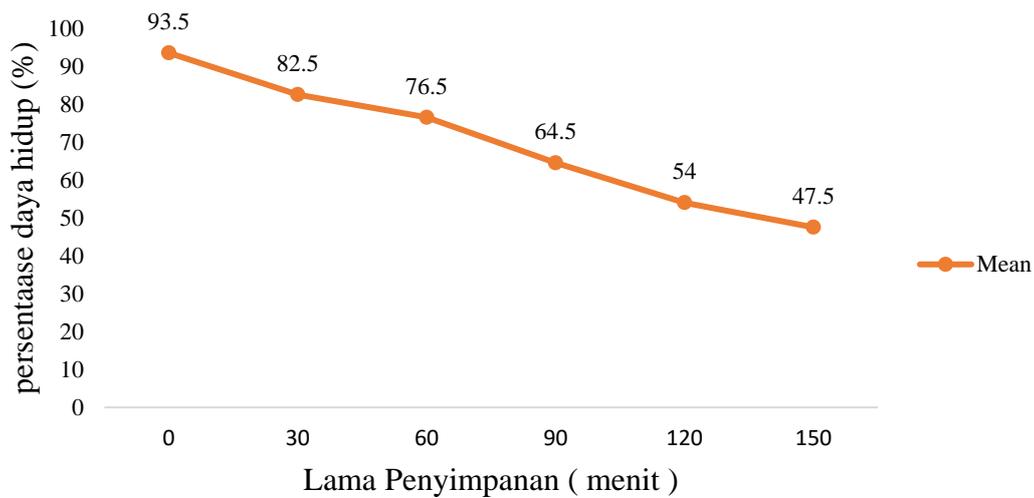
Lama Penyimpanan (T)	Motilitas Progresif (%) $\bar{x} \pm SD$	Daya Hidup (%) $\bar{x} \pm SD$
0 Menit	85,00±0,00 <sup>a</sup>	93,50±1,29 <sup>a</sup>
30 Menit	80,50±1,29 <sup>b</sup>	82,50±2,08 <sup>b</sup>
60 Menit	73,00±2,58 <sup>c</sup>	76,50±1,29 <sup>c</sup>
90 Menit	61,50±2,38 <sup>d</sup>	64,50±1,29 <sup>d</sup>
120 Menit	51,75±1,70 <sup>e</sup>	54,00±1,82 <sup>e</sup>
150 Menit	41,75±1,70 <sup>f</sup>	47,50±1,29 <sup>f</sup>

Keterangan: Notasi huruf super scrift yang berbeda ke arah kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ).

Grafik mengenai persentase rerata motilitas progresif spermatozoa ayam cemani disajikan pada Gambar 1, dan persentase daya hidupnya pada Gambar 2.



Gambar 1. Persentase motilitas progresif spermatozoa ayam cemani yang disimpan pada suhu ruang selama 150 menit



Gambar 2. Persentase rerata daya hidup spermatozoa ayam cemani yang disimpan pada suhu ruang selama 150 menit

Motilitas tinggi pada awal penelitian (Gambar 1) terjadi karena tersedianya sumber energi yang dibutuhkan, dan motilitas sel spermatozoa berhubungan erat dengan proses metabolisme spermatozoa. Metabolisme bertujuan untuk menghasilkan ATP dan ADP yang dipergunakan untuk motilitas sel spermatozoa. Bila persediaan fosfat organik dalam ATP habis, maka kontraksi fibril sel spermatozoa berhenti sehingga motilitas juga berhenti (Priscilla *et al.*, 2016).

Dari hasil pengamatan didapatkan rata-rata persentase daya hidup sperma terendah menggunakan pengencer susu skim fosfat pada penyimpanan suhu 29°C adalah 47,5% selama 150 menit (Gambar 2). Penurunan persentase dipengaruhi oleh nutrisi dan lama penyimpanan semen, semakin lama semen disimpan semakin berkurang juga jumlah energi dalam pengencer yang menyebabkan daya hidup spermatozoa ayam cemani yang diteliti menurun. Selain itu, spermatozoa yang mati dapat menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga menyebabkan kualitas spermatozoa secara umum menurun (Yulnawati dan Setiadi, 2005). Lama penyimpanan semen juga dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Semen ayam cemani yang disimpan pada suhu 29°C mengakibatkan penurunan motilitas, karena proses penurunan suhu semen dari tubuh ayam jantan menuju suhu lingkungan menyebabkan terjadinya *shock* sehingga motilitas menurun.

Bahan pengencer yang digunakan adalah susu skim fosfat dan larutan PBS. Menurut Suryaningsih *et al.* (2015), susu skim mengandung protein sebesar 37,4% dan lemak sebesar 0,5%, susu skim hanya menyediakan zat-zat energi bagi spermatozoa sehingga diperlukan

penyangga berupa larutan PBS, yang merupakan larutan fisiologis yang bersifat isotonis dan tidak beracun terhadap sel, membantu agar pH dan tekanan osmosis tetap stabil sehingga tidak menyebabkan penurunan yang signifikan pada aktivitas spermatozoa.

Pengamatan daya hidup spermatozoa dilakukan dengan metode pewarnaan eosin nigrosin. Spermatozoa yang mati menyerap zat warna merah karena permeabilitas dinding selnya telah melemah atau rusak (Toelihere, 1993). Keberadaan zat yang bersifat toksik baik bersumber dari spermatozoa yang telah mati maupun berasal dari zat yang terkandung dalam pengencer yang telah mengalami oksidasi akibat penyimpanan dapat menyebabkan tingginya kadar radikal bebas yang dapat merusak keutuhan membran plasma yang secara umum menurunkan kualitas spermatozoa (Bebas *et al.*, 2016).

Hasil penelitian penyimpanan spermatozoa ayam cemani dengan susu skim fosfat pada suhu 29°C ini sudah sejalan dengan penelitian ayam pelung yang dilaporkan Kusuma *et al.* (2018) yang menggunakan pengencer kuning telur fosfat, pada ayam hutan hijau (Bebas dan Laksmi, 2015), dan pada burung puyuh (Priscilla *et al.*, 2016), yaitu semakin lama semen disimpan maka persentase motilitas dan daya hidup spermatozoa semakin menurun secara cepat mau pun lambat.

### **SIMPULAN**

Berdasarkan dari penelitian yang telah dilakukan didapat bahwa motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani yang disimpan dalam pengencer susu skim fosfat pada suhu 29°C selama 150 menit mendapatkan persentase motilitas spermatozoa 41,75% dan daya hidup Sperma 47,5%. Simpulan dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penyimpanan semen ayam cemani menggunakan pengencer susu skim fosfat pada suhu 29°C layak digunakan untuk IB hingga 150 menit waktu penyimpanan.

### **SARAN**

Pelaksanaan teknologi IB pada ayam cemani dengan pengencer semen susu skim fosfat yang disimpan pada suhu 29°C sebaiknya digunakan tidak lebih dari 150 menit, supaya didapatkan hasil yang optimal dalam keberhasilan IB.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana yang telah memberikan fasilitas sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bebas W, Laksmi DNDI. 2015. Viabilitas Spermatozoa Ayam Hutan Hijau Dalam Pengencer Fosfat Kuning Telur Ditambah Laktosa Pada Penyimpanan 5°C. *Jurnal Veteriner* 16(1): 62-67.
- Bebas W, Pemayun TGO, Damriyasa IM, Mantik-Astawa IN. 2016. Lactose- Astaxanthin Increases Green Jungle Fowl's Sperm Motility and Reduces Sperm DNA Fragmentation During 5° Celsius Storage. *Bali Medical Journal* 4(1): 152-156
- Budipitojo T, Pangestiningih TW, Wijayanto H, Kusindarta TL, Musana DK. 2017. Studi Distribusi Glukosa Transporter 4 pada Otot Skelet Ayam Kedu Cemani. *Jurnal Sains Veteriner* 35: 254-259.
- Danang D R. 2012. Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung Dalam Pengencer Ringer's Pada Suhu 40°C. *Jurnal Ternak Tropika* 13(1): 47-57.
- Garner DL, dan Hafez ESE. 1987. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In: Hafez ESE. (ed). *Reproduction in Farm Animals*. 5th Ed. Philadelphia: Lea and Febiger. Hlm. 189-209.
- Iskandar S. 2006. Strategi Pengembangan Ayam Lokal. *Wartazoa* 16(4): 190-197.
- Johari S, Sutopo, Santi A. 2009. *Frekuensi Fenotipik Sifat-Sifat Kualitatif Ayam Kedu Dewasa*. Seminar Nasional Kebangkitan Peternakan. Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang, 20 Mei 2009. Hlm. 606-616.
- Junaedi, Arifiantini RI, Sumantri, C, Gunawan A. 2016. Penggunaan Dimethyl Sulfoxide Sebagai Krioprotektan Dalam Pembekuan Semen Ayam Kampung. *Jurnal Veteriner* 17(2): 300-308.
- Kusuma PT, Bebas W, Budiasa MK. 2018 Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Pelung Dalam Pengencer Kuning Telur Fosfat yang Disimpan Pada Suhu 29°C *Indonesia Medicus Veterinus* 7(2): 115-122
- Malik A, Haron AW, Yusof R, Nesa M, Bukar M, Kasim A. 2013. Evaluation of The Ejaculate Quality of The Red Jungle Fowl, Domestic Chicken, And Bantam Chicken in Malaysia. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 37: 564-568.
- Masruro YA. 2017. Pengecatan Imunohistokimia Her2 Menggunakan Susu Skim dan Normal Serum. Semarang: *Biomedika* 10(1): 52-55.
- Priscilla PM, Budiasa MK, Bebas IW. 2016. Lama Penyimpanan Semen aBurung Puyuh Pada Suhu 29°C Dengan Pengencer Fosfat Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa. Denpasar: *Indonesia Medicus Veterinus* 5(3): 288-295.
- Saili T, Toelihere MR. 2005. Pengelolaan Semen dan Inseminasi Buatan. *Impasja* 1: 1-8.
- Samariyanto. 2010. *Arah Pengembangan dan Pembibitan Ayam Lokal Indonesia*. Lokakarya Nasional Inovasi Teknologi Pengembangan Ayam Lokal. Magelang. Perpustakaan Puslitbang. Hlm. 3-9.
- Sastrodihardjo S, Resnawati H. 1999. *Inseminasi Buatan Pada Ayam Buras*. Jakarta. Penebar Swadaya. Hlm. 5-12.

- Solihati N, Andikarta EW, Setiawan R, Yani D, Rizal M. 2006. Kualitas Spermatozoa Cauda Epididymis Sapi Peranakan Ongole Dalam Pengencer Susu dan Sitrat Kuning Telur Pada Penyimpanan 4-5 °C. *Journal Animal Production* 10(1): 22-29.
- Sopiyana S, Iskandar S, Susanti T, Yogaswara D. 2006. Pengaruh Krioprotektan Dma, Dmf dan Glycerol pada Proses Pembekuan Semen Ayam Kampung. Pros Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 11-12 Nopember 2008. Hlm. 702-708.
- Suryaningsih Y, Dwika B, Setiawan B. 2015. Substitusi Susu Skim Dengan Tepung Kedelai Sebagai Bahan Pengikat Fungsional Nugget Daging Kerbau. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan* 4(1): 32-35
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Bandung. Angkasa.
- Utomo S, Sumaryati. 2001. Kualitas Sperma dan Pengaruh Bahan Pengencer Terhadap Daya Hidup Spermatozoa Domba Lokal. *Buletin Pertanian dan Peternakan* 2(3): 14-20.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas Dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididymis Kucing Selama Penyimpanan Pada Suhu 4° C. *Jurnal Media Kedokteran Hewan* 21(3): 100-104.