

Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Ayam Cemani Berpengencer Kuning Telur dan Air Kelapa Hijau pada Penyimpanan Suhu Ruang

(VIABILITY AND MOTILITY OF CEMANI ROOSTER SPERMATOZOA IN EGG YOLKS AND GREEN COCONUT WATER DILUENT AT ROOM TEMPERATURE STORAGE)

**Made Novi Lerianti Heros¹,
Wayan Bebas², I Gusti Ngurah Bagus Trilaksana²**

¹Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan,
²Laboratorium Reproduksi dan Kemajiran Veteriner
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234
Telp/Fax. (0361)223791.
E-mail: novilerianti@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani pada pengencer kuning telur dan air kelapa hijau yang disimpan pada suhu ruang. Rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tujuh perlakuan, lama waktu penyimpanan sebagai perlakuan masing masing: $T_0 = 0$ menit penyimpanan; $T_1 = 30$ menit penyimpanan; $T_2 = 60$ menit penyimpanan; $T_3 = 90$ menit penyimpanan; $T_4 = 120$ menit penyimpanan; $T_5 = 150$ menit penyimpanan; $T_6 = 180$ menit penyimpanan. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Parameter yang diamati adalah motilitas (%) dan daya hidup spermatozoa (%). Data hasil penelitian dianalisis dengan sidik ragam, apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan, dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama waktu penyimpanan berpengaruh nyata terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa. Rerata motilitas spermatozoa yang didapat yaitu: $T_0 = 82,50\%$; $T_1 = 75,00\%$; $T_2 = 66,50\%$; $T_3 = 53,50\%$; $T_4 = 45,00\%$; $T_5 = 35,50\%$; dan $T_6 = 19,75\%$. Rerata daya hidup spermatozoa yang didapat yaitu $T_0 = 86,00\%$, $T_1 = 79,00\%$, $T_2 = 66,25\%$, $T_3 = 59,50\%$, $T_4 = 46,25\%$, $T_5 = 37,50\%$, dan $T_6 = 30,50\%$. Semen ayam cemani yang disimpan pada suhu ruang dengan menggunakan pengencer kuning telur dan air kelapa hijau layak digunakan untuk IB sampai 120 menit lama penyimpanan (motilitas 45% dan daya hidup 46,2%).

Kata-kata kunci: ayam cemani; air kelapa hijau; daya hidup; kuning telur; motilitas; suhu ruang

ABSTRAK

This study aims to determine the motility and viability of cemani rooster spermatozoa in egg yolk and green coconut water diluent stored at room temperature. This research used a completely randomized design (CRD) with seven treatments of storage time duration as each treatment: $T_0 = 0$ minutes of storage; $T_1 = 30$ minutes of storage; $T_2 = 60$ minutes of storage; $T_3 = 90$ minutes of storage; $T_4 = 120$ minutes of storage; $T_5 = 160$ minutes of storage; $T_6 = 180$ minutes of storage. Each treatment group was repeated four times. Parameters observed were motility (%) and viability of spermatozoa (%). The research data were analyzed using analysis of variance, if there were significant differences between the treatments, it was continued with the Duncan test. The results showed that the length of storage time had a significant difference on the motility and viability of spermatozoa. The average motility spermatozoa obtained are: $T_0 = 82.50\%$; $T_1 = 75.00\%$; $T_2 = 66.50\%$; $T_3 = 53.50\%$; $T_4 = 45.00\%$; $T_5 = 35.50\%$; and $T_6 = 19.75\%$. The average viability spermatozoa obtained are $T_0 = 86.00\%$, $T_1 = 79.00\%$, $T_2 = 66.25\%$, $T_3 = 59.50\%$, $T_4 = 46.25\%$, $T_5 = 37.50\%$, and $T_6 = 30.50\%$. Semen ayam

cemani chicken stored at room temperature by using egg yolk and green coconut water diluent is worth using up to 120 minutes of storage duration (motility 45% and viability 46.2%).

Keywords: Cemani rooster; green coconut water; viability; egg yolk; motility; room temperature

PENDAHULUAN

Ayam cemani berasal dari daerah Karesidenan Kedu, Jawa Tengah dan banyak ditemukan terutama di Kabupaten Temanggung. Ayam cemani sudah ada sejak sebelum zaman Majapahit, dari dulu ayam cemani digunakan sebagai ritual oleh nenek moyang dalam upacara-upacara adat. Ayam cemani termasuk ayam kampung (*Gallus domesticus*) mempunyai karakteristik spesifik ditandai dengan seluruh warna bulunya yang hitam, bahkan ada yang seluruh tubuhnya dari kulit, daging, tulang, paruh, kloaka, jengger, wajah, kaki berwarna hitam (Muryanto *et al.*, 1993).

Ayam cemani merupakan ayam lokal khas yang patut dilestarikan sebagai plasma nutfah. Ayam cemani sangat berpeluang menjadi sebuah bisnis komersial karena keuntungan dalam segi harga sangatlah tinggi. Selain karena kesitimewaannya yang membuat harganya mahal, juga karena pasokannya relatif kecil, jadi ketika permintaan tinggi, sedangkan pasokannya kecil, maka hukum ekonomi akan berbicara, harga pun akan tinggi. Permasalahan yang sering ditemui dalam pembudidayaan ayam cemani adalah penyediaan bibit ayam cemani unggul. Pencarian calon bibit unggul didasarkan dari tampilan luarnya dan juga bisa dilakukan dengan pemuliaan ternak sehingga diperoleh bibit unggul, yang pada gilirannya dapat meningkatkan produktivitas ternak (Darwati, 2000). Produksi telur pada pemeliharaan diumbar dan semi intensif berkisar 56-77 butir/ekor/tahun, berbeda dari ayam petelur yang dipelihara secara intensif dalam kandang baterai dapat mencapai 215 butir/ekor/tahun. Salah satu langkah untuk meningkatkan produktivitas ayam cemani adalah dengan menggunakan metode inseminasi buatan (IB).

Teknik IB adalah cara memindahkan semen pejantan yang sudah diencerkan dengan pengencer tertentu ke dalam saluran reproduksi betina yang sedang dalam masa produktif secara buatan atau dengan bantuan manusia. Inseminasi buatan memiliki keunggulan yaitu mencegah penularan penyakit secara seksual dengan menghindari kontak-kontak kelamin pada waktu perkawinan, dan membubuhi antibiotik ke dalam semen sebelum dipakai. Selain itu dengan IB daya guna seekor pejantan yang secara genetik unggul dapat dimanfaatkan semaksimal mungkin. Pejantan-pejantan yang digunakan dalam IB telah dilakukan seleksi secara teliti dan ilmiah dari hasil perkawinan betina-betina dengan pejantan unggul sehingga

akan menghasilkan bibit yang unggul.cccc

Kualitas semen untuk IB sangat ditentukan oleh jenis bahan pengencernya. Pengencer berfungsi dalam memperbanyak volume semen, menyediakan zat-zat makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa, melindungi spermatozoa dari cekaman dingin atau *cold shock*, menyediakan suatu penyangga untuk mencegah perubahan pH akibat pembentukan asam laktat dari hasil metabolisme spermatozoa, mempertahankan tekanan osmotik dan keseimbangan elektrolit yang sesuai, mengandung unsur-unsur yang sifat fisikokimia hampir sama dengan semen dan tidak mengandung zat yang bersifat toksik bagi spermatozoa maupun saluran kelamin betina serta mencegah pertumbuhan mikroorganisme.

Daya fertilisasi optimum spermatozoa harus dipertahankan untuk beberapa lama setelah penampungan untuk mempertahankan motilitas dan viabilitasnya agar penggunaan pejantan yang bebas penyakit dan bermutu genetik tinggi secara maksimal dapat tercapai dalam program IB (Dwitarizki *et al.*, 2015). Menurut Toelihere (1993), syarat pengencer yang digunakan adalah murah, sederhana dan praktis dibuat, mengandung unsur-unsur yang hampir sama sifat fisik dan kimiawi dengan semen, tidak mengandung zat racun baik terhadap spermatozoa maupun saluran kelamin betina, tetap mempertahankan dan tidak membatasi daya fertilisasi spermatozoa, dan memungkinkan dilakukannya penilaian spermatozoa setelah pengenceran.

Air kelapa mengandung unsur karbon berupa karbohidrat sederhana, seperti: glukosa, sukrosa, dan fruktosa (Kuberski *et al.*, 1979). Kelapa dengan kematangan penuh kandungan glukosa dan fruktosa mengalami penurunan, masing-masing dari 40% hingga 10% dan 55% hingga 25% dari total gula terlarut (Assa *et al.*, 2007). Kelapa hijau adalah kelapa berumur 6-8 bulan DAN pada tahap tersebut, kandungan sukrosa meningkat hingga 40% dari total gula terlarut pada tahap kematangan penuh. Air kelapa hijau adalah cairan isotonis alami yang banyak digunakan sebagai pengganti cairan tubuh yang hilang. Air kelapa hijau mengandung glukosa, mineral, vitamin dan protein. Hayati (2009) menyatakan bahwa kandungan karbohidrat air kelapa muda lebih besar dibandingkan air kelapa tua, yaitu sebesar 6,3% sedangkan air kelapa tua sebesar 6,2%. Karbohidrat yang berupa glukosa dan fruktosa dapat dijadikan sumber energi bagi spermatozoa dan diharapkan mampu mempertahankan kehidupan spermatozoa. Kewilaa (2013) menyatakan bahwa spermatozoa memanfaatkan fruktosa dan glukosa sebagai sumber energi dalam proses pergerakannya sehingga tetap motil dan mempertahankan daya hidupnya.

Menurut Toelihere (1993), kuning telur memiliki komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa, mengandung fraksi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. Kuning telur mengandung glukosa yang lebih efektif digunakan oleh spermatozoa, serta protein memiliki viskositas yang menguntungkan bagi spermatozoa (Toelihere, 1993).

Perbedaan komposisi kimia antar spesies unggas terutama terletak pada jumlah dan proporsi zat-zat yang dikandungnya, yang umumnya dipengaruhi oleh strain, makanan dan lingkungan. Telur ayam ras dan ayam kampung memiliki kandungan gizi yang tidak berbeda jauh. Jika dilihat dari komposisi kimia kandungan protein telur ayam ras dan ayam kampung memiliki kandungan protein yang tidak berbeda jauh. Perbedaan yang lebih terlihat hanya pada kandungan lemaknya. Menurut Muchtadi *et al.* (2010), komposisi kimia yang dimiliki telur ayam kampung adalah protein sebesar 13,4% dan lemak sebesar 10,3%.

Peranan pengencer terhadap kualitas semen selama penyimpanan cukup besar, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui daya hidup dan motilitas spermatozoa ayam cemani dalam pengencer air kelapa hijau dan kuning telur yang disimpan pada suhu ruang.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam cemani jantan berumur kurang lebih delapan bulan sebagai sumber semen dan sebelum dilakukan penampungan semen, ayam diadaptasikan selama satu minggu. Pembuatan pengencer menggunakan air kelapa hijau yang dituang ke dalam gelas ukur sebanyak volume yang dibutuhkan. Kemudian telur ayam kampung segar disiapkan dan dibersihkan kulitnya memakai kapas beralkohol 70%. Semua cairan putih telur dibuang dan kuning telur utuh yang terbungkus selaput vitelin dipindahkan ke atas kertas saring untuk menghilangkan cairan putih telur yang tersisa. Kuning telur ditambahkan ke dalam air kelapa hijau dibuat konsentrasi 10% yaitu dengan menambahkan 10 mL kuning telur ke dalam 90 mL air kelapa hijau. Tambahkan antibiotik penisilin dan streptomisin masing-masing sebanyak 0,1 mg/mL kemudian larutan pengencer dihomogenkan lalu ditutup menggunakan aluminium foil. Penambahan antibiotik ke dalam bahan pengencer berfungsi untuk melindungi spermatozoa dari kontaminasi mikroorganisme.

Penampungan semen pada ayam cemani dilakukan dengan menggunakan metode *massage* (metode pemijatan). Penampungan dilakukan oleh dua orang, satu orang sebagai

pemegang ayam dan melakukan pemijatan, sedangkan satu orang lagi melakukan penampungan semen. Pada saat pemijatan, tangan membentuk sudut 45° dengan tulang punggung ayam pejantan. Pemijatan dilakukan berulang kali sampai ayam pejantan ereksi maksimal yang ditandai dengan naiknya bulu ekor dan keluarnya papillae dari kloaka. Semen yang keluar ditampung di cawan petri dan dihindari dari kontaminasi oleh kotoran (Sastrodiharjo dan Resnawati, 1999). Semen dari kedua pejantan dikumpulkan kemudian dihomogenkan dan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis (volume, warna, pH, bau, dan konsistensi) dan mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi). Setelah kualitas semen diketahui kemudian diencerkan dengan kuning telur dan air kelapa hijau.

Penyimpanan semen yang telah diencerkan dilakukan pada suhu ruang antara 29°C hingga 30°C. Pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara mengambil semen yang telah diencerkan menggunakan spuit dan diletakkan pada gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali untuk menghitung persentase spermatozoa yang bergerak progresif.

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

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan sidik ragam dengan aplikasi SPSS. Bila terjadi perbedaan yang bermakna pada perlakuan maka dilanjutkan menggunakan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pemeriksaan semen secara makroskopis dan mikroskopis diperoleh data seperti disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Gambaran mikroskopis dan makroskopis semen ayam cemani

Pemeriksaan	Hasil
Pengamatan Makroskopis	
Volume (mL)	0,5
Warna	Putih krem
pH	7,4
Konsistensi	Kental
Bau	Spesifik
Pengamatan Mikroskopis	
Gerakan Massa	+++
Motilitas Progresif (%)	87
Konsentrasi (10^6)	5027
Spermatozoa Hidup (%)	91
Abnormalitas (%)	5

Untuk menunjang pelaksanaan dan keberhasilan inseminasi buatan, spermatozoa harus memiliki motilitas dan daya hidup yang tinggi. Semen yang telah dievaluasi dalam penelitian ini dapat dikatakan layak untuk inseminasi buatan. Hal ini dapat dilihat dari pergerakan massa spermatozoa ayam cemani dengan nilai +++, motilitas progresif 87%, daya hidup 91%, dan abnormalitas 5%. Sastrodihardjo dan Resnawati (1999) menyatakan bahwa semen layak digunakan untuk IB bila memenuhi syarat persentase viabilitas di atas 45% dan motilitas individu di atas 40%.

Tabel 2. Motilitas progresif spermatozoa dan daya hidup ayam cemani pada pengencer air kelapa hijau dan kuning telur yang disimpan pada suhu ruang

Lama Penyimpanan (T)	Motilitas Progresif(%)	Daya Hidup(%)
0 Menit	82,50 ± 2,08	86,00 ± 3,91
30 Menit	75,00 ± 3,55	79,00 ± 3,36
60 Menit	66,50 ± 5,44	66,25 ± 2,98
90 Menit	53,50 ± 4,65	59,50 ± 3,31
120 Menit	45,00 ± 4,96	46,25 ± 6,50
150 Menit	35,50 ± 4,79	37,50 ± 5,50
180 Menit	19,75 ± 4,64	30,50 ± 5,19

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama waktu penyimpanan berpengaruh nyata ($p < 0,05$) terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa (Tabel 2). Rerata motilitas spermatozoa yang didapat yaitu: $T_0 = 82,50\%$; $T_1 = 75,00\%$; $T_2 = 66,50\%$; $T_3 = 53,50\%$; $T_4 = 45,00\%$; $T_5 = 35,50\%$; dan $T_6 = 19,75\%$. Rerata daya hidup spermatozoa yang didapat yaitu $T_0 = 86,00\%$, $T_1 = 79,00\%$, $T_2 = 66,25\%$, $T_3 = 59,50\%$, $T_4 = 46,25\%$, $T_5 = 37,50\%$, dan $T_6 = 30,50\%$. Pada penelitian ini penyimpanan semen ayam cemani pada pengencer air kelapa hijau dan

kuning telur menghasilkan motilitas spermatozoa yang layak untuk diinseminasikan ke induk ayam dengan lama penyimpanan pada suhu ruangan kurang dari 120 menit. Semen yang disimpan selama 120 menit memiliki rata-rata motilitas 45%. Solihati *et al.* (2006) menyatakan bahwa motilitas terendah yang harus dimiliki semen untuk melakukan inseminasi buatan adalah 40%.

Menurut Toelihere (1993), kadar asam laktat yang cukup tinggi dapat menghambat aktivitas metabolisme spermatozoa dan juga merupakan racun bagi spermatozoa. Motilitas yang tinggi pada awal penelitian terjadi karena tersedianya sumber energi yang dibutuhkan. Motilitas sel spermatozoa berhubungan erat dengan proses metabolisme spermatozoa. Motilitas spermatozoa juga dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Penurunan ini dapat disebabkan oleh penurunan suhu mulai dari dalam tubuh hewan jantan menuju suhu lingkungan, di samping itu juga terjadi perubahan lingkungan yang berbeda dari kondisi lingkungan cair hasil sekresi kelenjar kelamin jantan menuju cairan pengencer yang digunakan serta kondisi proses keseimbangan sel-sel spermatozoa selama proses pengenceran.

Semen yang layak digunakan untuk inseminasi buatan harus memenuhi syarat persentase daya hidup di atas 45% (Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999). Pada penelitian ini didapatkan daya hidup semen sebesar 46,25% setelah penyimpanan dalam suhu ruang selama 120 menit. Persentase daya hidup spermatozoa yang menurun dipengaruhi oleh nutrisi dan lama penyimpanan semen. Nutrisi dalam pengencer digunakan untuk bertahan hidup pada masa penyimpanan semen. Semakin lama spermatozoa disimpan, semakin berkurang juga jumlah energi dalam pengencer, hal tersebut menyebabkan daya hidup spermatozoa ayam cemani semakin menurun.

Komponen air kelapa hijau dalam pengencer mampu mempertahankan motilitas spermatozoa selama penyimpanan karena mengandung gula sebagai sumber energi. Menurut Reddy dan Lakshmi (2014), air kelapa hijau mengandung 95% air, 5% gula yang terdiri dari glukosa, fruktosa dan sukrosa. Metabolisme gula oleh spermatozoa menghasilkan *Adenosine Triphosphate/ATP* yang digunakan dalam proses pergerakan (motilitas), selain itu juga digunakan untuk mempertahankan aktivitas transpor aktif pada membran sel spermatozoa. Selain itu, air kelapa hijau kaya kandungan mineral (elektrolit) seperti potasium, kalsium, magnesium, mangan dan sejumlah kecil sodium. Mineral-mineral tersebut sama dengan yang terdapat dalam semen ayam sebagaimana yang dikemukakan dalam hasil review oleh Getachew (2016).

Menurut Toelihere (1993), kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan

lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein sel spermatozoa. Kuning telur mengandung fraksi *low density lipoprotein* (LDL) yang berfungsi menjaga stabilitas membran akrosomal, berperan sebagai *buffer*, menjaga tekanan osmosis, mencegah kerusakan sel secara mekanik, mengandung faktor pertumbuhan, mengandung vitamin yang larut dan tak larut air (Yang *et al.*, 2012). Kuning telur memberikan sumber nutrisi bagi spermatozoa yang digunakan untuk bertahan hidup selama masa penyimpanan semen. Menurut Solihati *et al.* (2006), semakin lama waktu penyimpanan menyebabkan motilitas spermatozoa terus mengalami penurunan karena persediaan energi semakin terbatas. Selama penyimpanan, spermatozoa tetap melakukan aktivitas seperti pergerakan dan metabolisme.

SIMPULAN

Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani dalam pengencer air kelapa hijau dan kuning telur dapat dipertahankan selama 120 menit pada suhu ruang dengan motilitas 45% dan daya hidup 46,25%, dan layak digunakan dalam inseminasi buatan.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai angka fertilitas inseminasi buatan pada semen ayam cemani yang diencerkan menggunakan bahan pengencer air kelapa hijau dan kuning telur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Laboratorium Reproduksi dan Kemajiran Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana karena telah memberikan fasilitas untuk melakukan penelitian ini sehingga penelitian dapat berjalan dengan lancar.

DAFTAR PUSTAKA

- Assa RR, Konan JL, Agbo N, Prades A, Nemlin J. 2007. Caractéristiques physicochimiques de l'eau des fruits de quatre cultivars de cocotier (*Cocos nucifera L.*) en Côte d'Ivoire. *Agron Afr* 19: 41–51.
- Darwati S. 2000. Produktivitas Ayam Kampung, Pelung dan Resiprokalnya. *Media Peternakan* 23(2): 32-35.
- Dwitarizki, Dimar N, Ismaya, Asmarawati W. 2015. Pengaruh Pengenceran Sperma dengan Air Kelapa dan Aras Kuning Telur Itik Serta Lama Penyimpananan Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Garut pada Penyimpanan 5°C. *Buletin Peternakan* 39(3): 149-156.

- Getachew T. 2016. A review article of artificial insemination in poultry. *World's Veterinary Journal* 6(1): 25-33
- Hayati R. 2009. Perbandingan Susunan dan Kandungan Asam Lemak Kelapa Muda dan Kelapa (*Cocos nucifera L.*) Tua dengan Metode Gas Kromatografi. *Jurnal Floratek* 4(1): 18-28.
- Kewilaa AI, Ondho YS, Enny ST. 2013. Pengaruh Berbagai Jenis Pengencer Air Kelapa Muda dengan Penambahan Kuning Telur yang Berbeda terhadap Kualitas Spermatozoa Semen Cair Domba Ekor Tipis (DET). *Agrinimal* 3(1): 1-9.
- Kuberski T, Roberts A, Linehan B, Bryden RN, Teburae M. 1979. Coconut water as a rehydration fluid. *New Zealand Med J* 90: 98-100.
- Muchtadi, T. R, Ayunstaningwarno, F dan Sugiono 2010. *Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan*. Bandung. Penerbit *Alfabeta*, Hlm. 20.
- Muryanto, Gultom D, Subiharta, Dirdjopraton W. 1993. Evaluasi produktivitas ayam Kedu hitam yang dipelihara secara semi intensif dan intensif. *Jurnal Ilmiah Penelitian Ternak Klepu* 1: 19-26.
- Reddy EP, Lakshmi TM. 2014. Coconut water-properties uses nutritional benefits in health and wealth and health and disease: a review. *Journal of Current Trends in Clinical Medicine and Laboratory Biochemistry* 2(2): 6-18.
- Sastrodihardjo S, Resnawati H. 1999. *Inseminasi Buatan pada Ayam Buras*. Jakarta. Penebar Swadaya. Hlm. 242-249.
- Solihati N, Idi R, Setiawan R, Asmara IY, Sujana BI. 2006. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Cair Ayam Buras pada Suhu 5°C Terhadap Periode Fertil dan Fertilitas Sperma. *Jurnal Ilmu Ternak* 6(1): 7-11.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung. Angkasa. Hlm. 75-89.
- Yang R, Jing Li J, Peng X, Song X-q, Yang J-l. 2012. Effect of egg yolk added to goose semen extender on the semen survival time. *Journal of Food Agriculture and Environment* 10(2): 491-492.