

Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Cemani dalam Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur pada Penyimpanan Suhu 4°C

(*MOTILITY AND VIABILITY OF CEMANI ROOSTER SPERMATOZOA IN EGG YOLK LACTATE RINGER DILUENT AT 4 °C STORAGE*)

Yoga Mehendra Pandia¹,
Wayan Bebas², Tjok Gde Oka Pelayun²

¹Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan,

²Laboratorium Reproduksi Veteriner,

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana,
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234,

Telp/Fax: (0361) 223791.

E-mail: yogamahendrap@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan semen ayam cemani terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa pada pengencer ringer laktat kuning telur yang disimpan pada suhu 4°C. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tujuh kelompok perlakuan lama penyimpanan, yaitu T0 = penyimpanan selama 0 jam, T1 = penyimpanan selama 12 jam, T2 = penyimpanan selama 24 jam, T3 = penyimpanan selama 36 jam, T4 = penyimpanan selama 48 jam, T5 = penyimpanan selama 60 jam, T6 = penyimpanan selama 72 jam. Variabel yang diamati berupa motilitas progresif (%) dan daya hidup spermatozoa (%). Motilitas diamati secara subyektif di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali, sedangkan daya hidup diamati dengan pengecatan eosin-nigrosin. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak empat kali. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji sidik ragam dan apabila terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji *Duncan*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama penyimpanan berpengaruh nyata terhadap motilitas dan daya hidup sperma. Setelah 70 jam penyimpanan didapatkan motilitas spermatozoa 42,00±0,8% dan daya hidup 44,00±0,82%. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa lama penyimpanan semen ayam cemani menggunakan pengencer ringer laktat kuning telur pada suhu 4° C masih layak digunakan selama 60 jam penyimpanan dengan motilitas 46,00±0,81% dan daya hidup 50,75±0,96%.

Kata-kata kunci: ayam cemani; daya hidup; motilitas spermatozoa; penyimpanan 4°C; ringer laktat kuning telur

ABSTRACT

The purpose of this research is to know the effect on motility and viability semen storage of cemani chicken spermatozoa with ringer's lactate and egg yolk stored at temperature of 4° C. This research using Complete Randomized Design (CRD) with seven treatment groups for each storage period: T0= storage for 0 hour, T1 = storage for 12 hours, T2 = storage for 24 hours, T3 = storage for 36 hours, T4 = storage for 48 hours, T5= storage for 60 hours, T6= storage for 72 hours. The observed variable was progressive motility (%) and viability (%). Motility was observed subjectively under a light microscope at 400 imes magnification and the viability was observed by staining eosin-nigrosin. Each treatment was repeated 4 times. The data obtained were analyzed using analysis of variance and in case are significant differences between treatments, the test is continued with the *Duncan* test. The results showed that storage time had a significant difference on sperm motility and viability. After 70

hours of storage, the spermatozoa motility was $42.00 \pm 0.8\%$ and the vitality was $44.00 \pm 0.82\%$. In this study, it can be concluded that the storage time of chicken cemani semen using egg yolk lactate diluent at 4°C is still suitable for 60 hours of storage with a motility of $46.00 \pm 0.81\%$ and $50.75 \pm 0.96\%$ survival.

Keywords: Cemani chicken; viability; motility of spermatozoa; stored at 4°C ; ringer's lactate egg yolk

PENDAHULUAN

Salah satu sumber plasma nutfah yang perlu dikembangkan di Indonesia adalah ayam lokal (Khaerudin *et al.*, 2015). Di Indonesia dilaporkan terdapat 32 jenis ayam lokal (*ecotype*) dan masing-masing jenis memiliki keunggulan tersendiri (Nataamijaya, 2010). Ayam cemani merupakan salah satu ayam lokal yang memiliki potensi sangat bagus untuk dikembangkan dan dibudidayakan.

Ayam cemani merupakan salah satu jenis dari ayam kedu yang berwarna hitam dan memiliki nilai ekonomis yang lebih tinggi dibanding dengan ayam kedu biasa. Ayam cemani mempunyai karakteristik spesifik ditandai dengan seluruh warna bulunya yang hitam, bahkan seluruh tubuhnya mulai dari kulit, daging, tulang, paruh, kloaka, jengger, muka, sampai kaki berwarna hitam, sehingga ayam cemani ini dikenal dengan sebutan ayam kedu hitam (Muryanto *et al.*, 1993). Peternak ayam kedu mempunyai kecenderungan hanya mengembangkan ayam cemani saja, karena harga jualnya yang lebih tinggi dan tidak mengalami kesulitan dalam pemasarannya. Oleh karena itu, banyak orang yang memburu dan mencarinya, sehingga pasokannya hingga saat ini langka, maka dari itu, kelestarian ayam cemani harus dijaga dan dipertahankan. Berbagai cara terus diupayakan dalam meningkatkan populasi dan kualitas ternak, salah satunya dengan penerapan teknologi reproduksi inseminasi buatan (IB).

Penerapan teknologi reproduksi berupa pelaksanaan IB pada unggas telah banyak dilakukan untuk meningkatkan mutu genetik melalui seleksi terhadap pejantan dan induk yang memiliki pertumbuhan dan produksi telur yang tinggi. Beberapa hal yang menjadi kendala dalam pelaksanaan inseminasi buatan antara lain volume semen yang dapat ditampung dari seekor pejantan sangat terbatas dan daya hidup spermatozoa sangat singkat. Spermatozoa hanya mampu hidup selama kurang lebih dua jam apabila disimpan tanpa dilakukan pengenceran (Toelihere, 1993), oleh karenanya dibutuhkan bahan pengencer yang dapat mempertahankan kualitas semen dan meningkatkan volume semen sebelum dilakukan

penyimpanan baik disimpan dingin (*chilled semen*) maupun disimpan beku (*frozen semen*) sebelum dilakukan IB.

Ringer laktat adalah salah satu bahan pengencer fisiologis, Na-Laktat pada ringer laktat diperlukan untuk memenuhi kebutuhan ion bikarbonat yang berfungsi untuk mempertahankan keasaman larutan atau sebagai penyangga larutan serta mempertahankan tekanan osmotik larutan. Asam laktat tersebut dinetralkan oleh Na sehingga pH larutan tetap seimbang. Ringer laktat yang ditambahkan dengan kuning telur mampu melindungi spermatozoa dari kejutan dingin. Kuning telur mengandung asam-asam amino, karbohidrat, vitamin, dan mineral untuk kebutuhan hidup spermatozoa. Kuning telur dapat membantu spermatozoa untuk menahan *cold shock*, mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan pada suhu dingin (Amirat *et al.*, 2004).

Hasil penelitian Solihati *et al.* (2006) menunjukkan fertilitas spermatozoa ayam kampung dengan bahan pengencer ringer laktat lebih tinggi dibandingkan dengan pengencer NaCl fisiologis 0,9% dan ringer dekstroza. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh lama simpan semen ayam cemani dalam pengencer ringer laktat kuning telur pada suhu 4°C terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam cemani jantan yang sudah dewasa kelamin berumur sekitar enam sampai delapan bulan sebagai sumber semen. Ayam diberi pakan butiran, jagung, dan konsentrat dengan perbandingan 1:1. Air minum diberi secukupnya dan sebelum dilakukan penampungan semen, ayam diadaptasikan selama satu minggu. Pada tahap ini hewan dilatih untuk mengeluarkan semen dengan metode pemijatan (*massage*). Semen yang telah ditampung kemudian dihomogenkan dan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis (volume, pH, bau, konsistensi) dan mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi). Setelah kualitas semen diketahui kemudian diencerkan dengan pengencer ringer laktat kuning telur.

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tujuh perlakuan, yaitu T0 atau kontrol (disimpan selama 0 jam), T1 (disimpan selama 12 jam), T2 (disimpan selama 24 jam), T3 (disimpan selama 36 jam), T4 (disimpan selama 48 jam), T5 (disimpan selama 60 jam), dan T6 (disimpan selama 72 jam). Pengulangan tiap perlakuan sebanyak empat kali. Jumlah sampel yang diperlukan dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$.

Dalam hal ini t adalah jumlah perlakuan. Penelitian ini menggunakan tujuh perlakuan sehingga diperoleh perhitungan $(7-1) (4-1) \geq 15$, dengan demikian ulangan yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan adalah empat, sehingga total jumlah sampel sebanyak 18 sampel.

Teknik Penampungan Semen

Teknik penampungan semen pada ayam cemani dilakukan dengan menggunakan metode *massage* (pemijatan) pada bagian punggung ayam. Penampungan dilakukan oleh dua orang, satu orang memegang ayam dan melakukan pemijatan, sedangkan satu orang lagi melakukan penampungan semen. Pada saat pemijatan, tangan membentuk sudut 45° terhadap tulang punggung (*os vertebrae lumbales et sacrales*) ayam pejantan. Semen yang keluar ditampung pada cawan petri dan dihindarkan dari kontaminasi oleh kotoran (Sastrodiharjo dan Resnawati, 1999).

Pembuatan Pengencer Ringer Laktat Kuning Telur

Pengencer ringer laktat kuning telur dibuat dengan cara mencampur 90 mL ringer laktat dengan 10 mL kuning telur, dan dilakukan pasteurisasi di atas kompor listrik selama 10 menit sambil diaduk agar homogen kemudian didinginkan. Setelah dihomogenkan dan didinginkan tambahkan antibiotik *penicillin* dan *streptomycin* masing-masing 0,1 mg/mL kemudian larutan pengencer dihomogenkan. Untuk membuat pengencer kuning telur dilakukan dengan memecahkan telur dibagian tengah untuk mendapatkan kuning telur yang masih utuh dan terpisah dari putih telur, agar kuning telur benar-benar bebas dari putih telur, maka kuning telur digelindingkan di atas kertas saring steril, kemudian kuning telur ditempatkan pada gelas beker dan dilakukan tusukan kuning telur agar pecah.

Evaluasi Semen

Pemeriksaan semen dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Penilaian semen secara makroskopis meliputi volume, bau, warna, derajat keasaman (pH) semen, sedangkan secara mikroskopis yaitu motilitas dan daya hidup.

Pengamatan Motilitas Spermatozoa

Pelaksanaan pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa yaitu dengan cara mengambil semen yang telah diencerkan. Pengambilan menggunakan spuit dan diletakan pada gelas objek kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali untuk menghitung persentase jumlah spermatozoa yang bergerak progresif.

Pengamatan Daya Hidup Spermatozoa

Penentuan presentase hidup spermatozoa dilakukan dengan metode pewarnaan eosin nigrosin. Satu tetes semen yang telah diencerkan diletakan pada gelas objek kemudian ditambahkan dengan satu tetes cairan pewarna eosin negrosin lalu dihomogenkan. Selanjutnya dibuat preparat ulas dengan cara menekan dan mendorong dengan menggunakan gelas objek 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 melemah sedangkan yang hidup kelihatan transparan (Toelihere, 1993).

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji sidik ragam dengan aplikasi SPSS versi 25 *for windows*. Data yang berbeda secara bermakna antar perlakuan, dilanjutkan menggunakan uji Duncan. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2020 di Laboratorium Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Tabel 1. Gambaran makroskopis dan mikroskopis semen segar ayam cemani

Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
Makroskopis	
Volume (mL)	0,5
Warna	Putih
pH	7,4
Konsistensi	Kental
Bau	Spesifik
Mikroskopis	
Gerakan Massa	+++ (Gerak Progresif)
Motilitas Progresif (%)	88
Konsentrasi (10^6)	5027
Sperma Hidup (%)	95
Abnormalitas (%)	7

Pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa semen segar hasil dari penampungan yang digunakan sebagai materi penelitian termasuk layak digunakan untuk inseminasi buatan dengan jumlah volume 0,5 mL. Volume semen yang didapat sesuai dengan yang dikemukakan

oleh Toelihere (1993) yaitu antara 0,3-1,5 mL. Semen yang didapatkan mempunyai konsistensi kental berwarna putih krem dan tidak tembus cahaya serta bau yang spesifik (amis). Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Johari *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa kualitas semen yang baik seharusnya kental dan berwarna putih krem dengan bau yang spesifik (amis). Warna, konsistensi dan konsentrasi memiliki hubungan yang erat satu sama lain. Semakin kental semen yang dihasilkan maka konsentrasi akan semakin tinggi dan warnanya akan semakin pekat. Pada penelitian ini di dapatkan pH 7,4. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan, bahwa semen unggas memiliki pH Antara 7,0-7,6. Derajat keasaman (pH) semen dipengaruhi dari proses metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerobik dan sangat berpengaruh terhadap daya hidup spermatozoa. Salah satu hasil dari proses metabolisme adalah asam laktat yang mampu menurunkan pH semen yang akhirnya menyebabkan kematian sel spermatozoa (Toelihere, 1993).

Semen yang telah dievaluasi dalam penelitian ini layak untuk inseminasi buatan. Hal ini dapat dilihat dari pergerakan massa spermatozoa ayam cemani dengan nilai +++, motilitas progresif 88%, daya hidup 95%, dan abnormalitas 7% Tabel 1, Tabel 2). Sastrodihardjo dan Resnawati (1999), menyatakan bahwa semen layak digunakan untuk IB bila memenuhi syarat persentase viabilitas diatas 45 % dan motilitas individu di atas 40% (Solihati *et al.*, 2006; Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999). Oleh karena itu semen yang telah dievaluasi layak untuk diproses lebih lanjut.

Pada penelitian ini semen ayam cemani pada pengencer ringer laktat kuning telur disimpan selama 72 jam memiliki rata-rata motilitas 42 % (Gambar 1). Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Solihati *et al.* (2006) bahwa motilitas terendah yang harus dimiliki semen untuk melakukan IB adalah 40%. Selama penyimpanan, spermatozoa tetap melakukan aktivitas pergerakan dan metabolisme, namun semakin lama waktu penyimpanan menyebabkan spermatozoa ayam cemani mengalami penurunan aktivitas karena terbatasnya ketersediaan energi. Motilitas (daya gerak) spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme (Danang *et al.*, 2012).

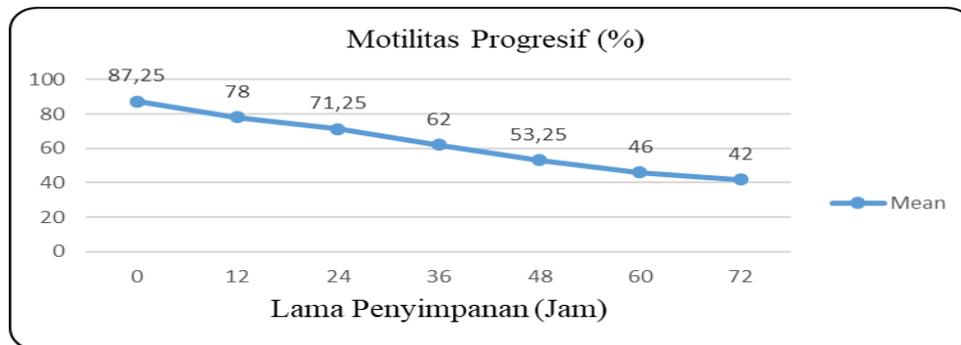
Semen yang layak digunakan untuk inseminasi buatan harus memenuhi syarat persentase daya hidup di atas 45% (Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999). Pada penelitian ini didapatkan daya hidup semen sebesar 50,75% setelah 60 jam (Gambar 2). Persentase daya hidup spermatozoa yang menurun dipengaruhi oleh nutrisi 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 yang menyebabkan daya hidup spermatozoa ayam cemani yang diteliti menurun.

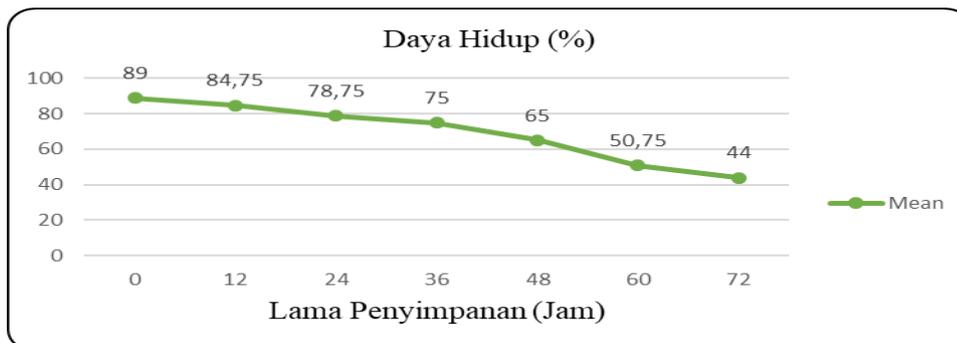
Tabel 2. Nilai rerata motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam cemani pada pengencer ringer laktat kuning telur yang disimpan pada suhu 4° C

Lama Penyimpanan (T)	Motilitas Progresif (%)	Daya Hidup (%)
0 Jam	87,25±0,95 ^a	89,00±0,82 ^a
12 Jam	78,00±0,81 ^b	84,75±0,96 ^b
24 Jam	71,25±0,95 ^c	78,75±0,96 ^c
36 Jam	62,00±0,82 ^d	75,00±0,81 ^d
48 Jam	53,25±0,96 ^e	65,00±0,82 ^e
60 Jam	46,00±0,81 ^f	50,75±0,96 ^f
70 Jam	42,00±4,08 ^g	44,00±0,82 ^g

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



Gambar 1. Persentase rerata motilitas progresif spermatozoa ayam cemani



Gambar 2. Persentase rerata daya hidup (%) spermatozoa ayam cemani

Pengencer ringer laktat memiliki bermacam-macam garam mineral yang memiliki daya penyangga pH (*buffer*) dan isotonik yang dapat mendukung motilitas spermatozoa dalam waktu yang lebih lama. Semen ayam mengandung unsur-unsur elektrolit berupa asam klorida, kalsium, kalium, natrium dan magnesium. Larutan ringer laktat memiliki kandungan sodium

klorida yang sama dengan unsur-unsur elektrolit dari plasma semen ayam seperti natrium, klorida, kalsium dan magnesium (Solihati *et al.*, 2006). Larutan pengencer yang hipertonik (larutan yang tekanan osmosisnya lebih tinggi) mengakibatkan air dalam sel keluar dan terjadi hidrolisis. Sebaliknya bila ditempatkan dalam larutan yang tekanan osmosisnya lebih rendah (hipotonik), air masuk ke dalam sel, sehingga sel menggelembung. Bila perbedaan tekanan osmosis lebih besar maka dinding sel pecah, oleh karena itu dalam penggunaan larutan pengencer harus memiliki tekanan osmosis yang sama (isotonis) dengan kondisi kebutuhan spermatozoa, agar tidak terjadi penurunan motilitas.

Dalam semen terdapat empat bahan organik yang dapat dipakai secara langsung maupun tidak langsung oleh spermatozoa sebagai sumber energi untuk kelangsungan hidup dan motilitas spermatozoa, bahan-bahan tersebut adalah fruktosa, serbitol, *glycerylphosphorylcholine* (GPC) dan plasmalogen. Menurut Marawali *et al.* (2001), fruktosa adalah substrat energi utama di dalam plasma semen yang telah diproduksi kelenjar vesikularis. Selain itu fruktosa merupakan turunan karbohidrat yang dapat dijadikan sumber energi untuk mendukung pergerakan (motilitas) dan ketahanan spermatozoa. Dalam larutan laktat ringar juga terdapat kandungan glukosa yang merupakan energi pengganti fruktosa dalam plasma semen yang diperlukan untuk aktivitas metabolisme selama penyimpanan. Dalam menjalankan aktivitas metabolisme dihasilkan asam laktat, bila tidak tersedia energi untuk merombak kembali asam laktat menjadi energi yang dibutuhkan untuk aktivitas gerak spermatozoa maka dapat menyebabkan menumpuknya asam laktat yang menyebabkan penurunan pH.

Faktor yang mempertahankan kualitas spermatozoa adalah kuning telur. Komponen spesifik kuning telur yang bertanggung jawab sebagai agen krioprotektif ialah lesitin, fosfolipid, ekstrak lipid, fraksi lipoprotein dan lipoprotein spesifik (Gazali dan Tambing, 2002). Menurut Paulenz *et al.* (2003), penambahan kuning telur yang berisi fosfolipid dan lesitin ke dalam pengencer, dapat melindungi membran spermatozoa terhadap kejutan dingin. Kuning telur yang mengandung LDL yang berfungsi menjaga stabilitas membran akrosoma, 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). Menurut Afiati *et al.* (2003) dan Toelihere (1993), nutrisi yang lengkap serta kandungan kuning telur dapat menunjang motilitas spermatozoa dan melindungi spermatozoa dari efek *cold shock* selama penyimpanan. Penelitian Rizal dan Herdis (2010), melaporkan

bahwa penambahan senyawa antioksidan, antara lain vitamin C, vitamin E, glutathion, dan β karoten ke dalam pengencer mampu meningkatkan kualitas semen beku berbagai hewan ternak.

Spermatozoa yang mati dapat menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga menyebabkan kualitas spermatozoa secara umum menurun (Yulnawati dan Setiadi, 2005). Keberadaan zat yang bersifat toksik baik yang berasal dari spermatozoa yang telah mati maupun yang berasal dari zat yang terkandung dari pengencer yang telah mengalami oksidasi akibat penyimpanan dapat menyebabkan tingginya kadar radikal bebas yang dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa (Bebas *et al.*, 2016). Bahan pengencer yang mengalami oksidasi dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa karena penyimpanan yang lama menyebabkan tingginya kadar radikal bebas.

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian pada penyimpanan semen ayam kampung (Mayesta *et al.*, 2014), pada kalkun (Atmaja *et al.*, 2014), dan pada ayam hutan hijau (Bebas dan Laksmi, 2015) semakin lama penyimpanan mengakibatkan semakin menurunnya motilitas progresif dan daya hidup.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada semen ayam cemani maka dapat disimpulkan bahwa motilitas 42% dicapai selama 72 jam penyimpanan, dan daya hidup 50,75% dicapai dalam 60 jam penyimpanan.

SARAN

Pelaksanaan teknologi inseminasi buatan pada ayam cemani dengan pengencer semen ringer laktat kuning telur disimpan pada suhu 4° C sebaiknya tidak lebih dari 60 jam, agar mendapatkan hasil yang optimal dalam menunjang keberhasilan inseminasi buatan, dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut guna mengetahui pengaruh lama penyimpanan semen terhadap fertilitas telur hasil IB dengan bahan pengencer ringer laktat kuning telur.

UCAPAN TERIMA KASIH

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

DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, Tappa B, Djuarsawidjaja. 2003. Pengaruh Perbandingan Kuning Telur Dan Air Kelapa Terhadap Daya Tahan Hidup (Viabilitas) Spermatozoa Sapi Hasil Pemisahan. *Media Peternakan* 26(3): 82-87.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L. 2004. Bull Semen In Vitro Fertility After Cryopreservation Using Egg Yolk LDL: Comparison with Optidyl, A Commercial Egg Yolk Extender. *Theriogenology* 6(1): 895-907.
- Atmaja WK, Budiasa MK, Bebas W. 2014. Penambahan Fruktosa Mempertahankan Motilitas Dan Daya Hidup Spermatozoa Kalkun Yang Disimpan Pada Suhu 4°C. *Indonesia Medicus Veterinus* 3(4): 318-327.
- 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, Astawa INM. 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.
- Danang DR, Insani N, Trisunuwati P. 2012. Pengaruh Lama Simpan Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Kampung Dalam Pengencer Ringer's Pada Suhu 4°C. *Jurnal Ternak Tropika* 13(1): 47-57.
- Gazali M, Tambing SN. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati* 9(1): 27-32.
- 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.
- Khaeruddin, Sumantri C, Darwati S, Arifiantini RI. 2015. Penggunaan Minyak Zaitun Ekstrak Virgin Ke Dalam Bahan Pengencer Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Lokal. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan* 3(1): 46-51.
- Marawali A, Thomas MH, Burhanuddin, Belli HLL. 2001. *Dasar-dasar Ilmu Reproduksi Ternak*. Kupang. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi.
- Mayesta DDM, Trilaksana IGNB, Bebas W. 2014. Motilitas Dan Daya Hidup Spermatozoa Ayam Dalam Pengencer Glukosa Kuning Telur Fosfat Pada Penyimpanan 3-5° C. *Indonesia Medicus Veterinus* 3(1): 43-52.
- Muryanto, Gultom D, Subiharta, Dirdjoprato W. 1993. Evaluasi Produktivitas Ayam Kedu Hitam yang Dipelihara Secara Semi Intensif Dan Intensif. *Jurnal Ilmiah Penelitian Ternak Klepu* 1: 19-26.
- Nataamijaya AG. 2010. The native chicken of indonesia. *Buletin Plasma Nutfah* 6(1): 1-6.
- Paulenz H, Soderqui L, Adnøy T, Fossen OH, Berg KA. 2003. Effect of Milk and Trisbased Extenders on The Fertility of Sheep Inseminated Vaginally Once or Twice with Liquid Semen. *Theriogenology* 60: 759-766.
- Rizal M, Herdis. 2010. Peranan Antioksidan Dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Wartazoa* 20: 3-6.
- Sastrodihardjo S, Resnawati H. 1999. *Inseminasi Buatan pada Ayam Buras*. Jakarta. Penebar Swadaya. Hlm 21-35.
- Solihati N, Idi R, Setiawan R, Asmara IY. 2006. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Cair Ayam Buras Pada Suhu 5°C Terhadap Periode Fertil Dan Fertilisasi Sperma. *Jurnal Ilmu Ternak*. 6 (1): 7-11.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Cetakan Ketiga. Bandung: Penerbit

Angkasa. Hlm 75-89.

Yang R, Jing Li, Peng X J, Song X Q, Yang J I. 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.

Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas Dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kucing Selama Penyimpanan Pada Suhu 4°C. *Jurnal Media Kedokteran Hewan*. 21(3): 100-104.