

**Daya Hidup dan Motilitas Spermatozoa Ayam Cemani
dalam Pengencer Kuning Telur Fosfat pada Penyimpanan 4°C**

*(VIABILITY AND MOTILITY OF CEMANI CHICKEN SPERMATOZOA
IN PHOSPHATE EGG YOLK EXTENDER AND STORED AT 4°C)*

**Nurul Ikhsanul Haq¹,
Wayan Bebas², Desak Nyoman Dewi Indira Laksmi²**

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

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hidup dan motilitas spermatozoa ayam cemani yang disimpan pada suhu 4°C dengan pengencer kuning telur fosfat. Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam cemani jantan berumur kurang lebih delapan bulan sebagai sumber semen. Ayam jantan cemani diberi pakan, jagung, dan konsentrat dengan perbandingan 1:1 dan diberi air secukupnya. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan tujuh perlakuan yaitu: kelompok I (T₀); kelompok kontrol semen disimpan 0 jam. Kelompok II (T₁); semen disimpan selama 12 jam. Kelompok III (T₂); semen disimpan selama 24 jam. Kelompok IV (T₃); semen disimpan selama 36 jam. Kelompok V (T₄); semen disimpan selama 48 jam. Kelompok VI (T₅); semen disimpan selama 60 jam. Kelompok VII (T₆); semen disimpan selama 72 jam. Variabel yang diamati selama penyimpanan adalah daya hidup dan motilitas progresif spermatozoa. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) dan dilanjutkan dengan uji Duncan jika berbeda nyata. Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama penyimpanan semen berpengaruh nyata terhadap motilitas dan daya hidup sperma dengan motilitas 56,25% dan daya hidup 51,25%. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penyimpanan semen ayam cemani pada suhu 4°C dengan menggunakan pengencer kuning telur fosfat menghasilkan motilitas dan daya hidup spermatozoa yang masih layak digunakan sampai 60 jam penyimpanan.

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

ABSTRACT

This study aims to determine the viability and motility of sperm chicken spermatozoa stored at 4°C with phosphate yolk diluents. This study used two male cemani chickens aged approximately eight months as a source of cement. Cemani roosters are fed, corn, and concentrate in a ratio of 1: 1: and given enough water. This study used a Completely Randomized Design with seven treatments, namely: group I (T₀); semen control group was kept 0 hours. Group II (T₁); semen is stored for 12 hours. Group III (T₂); semen is stored for 24 hours. Group IV (T₃); semen is stored for 36 hours. Group V (T₄); semen was stored for 48 hours in Group VI (T₅); semen is stored for 60 hours. Group VII (T₆); semen is stored for 72 hours. The variables observed during storage were viability and progressive motility of spermatozoa. The data obtained were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and if there are significant differences between treatments, the test is continued with the Duncan test. The results showed that the duration of the storage of semen

significantly affected the motility and viability of sperm with motility of 56.25% and viability of 51.25%. From the results of the study, it can be concluded that the storage of cemani chicken semen at 4°C using phosphate yolk diluents produces motility and viability of spermatozoa which are still suitable for use up to 60 hours of storage.

Keywords: cemani chicken; motility; viability; egg yolk phosphate; 4°C storage

PENDAHULUAN

Plasma nutfah ayam merupakan investasi daerah untuk masa depan. Keberadaan plasma nutfah tersebut akan memberikan keuntungan dan manfaat apabila dikelola dengan baik. Sementara itu unit kerja tingkat kabupaten dan masyarakat belum maksimal dalam mengelola plasma nutfah ini. Hal itu disebabkan karena kurangnya pemahaman terhadap pentingnya pelestarian plasma nutfah ayam asli Indonesia (Iskandar, 2006). Salah satu ayam lokal yang memiliki potensi tinggi untuk dikembangkan adalah ayam cemani.

Ayam cemani mempunyai karakteristik spesifik ditandai dengan seluruh warna bulunya yang hitam. Kulit, daging, tulang, paruh, kloaka, jengger, muka, dan kaki ayam cemani berwarna hitam, oleh sebab itu ayam cemani ini dikenal dengan sebutan ayam kedu hitam (Muryanto *et al.*, 1993). Ditinjau dari aspek produksi ayam cemani terbukti mempunyai produktivitas yang tinggi dibandingkan dengan ayam lokal lainnya dan permintaan pasarnya pun cukup terbuka (Wardani dan Keosnoto, 2014). Selain dari aspek produksi orang-orang lebih banyak menggunakan ayam cemani untuk upacara adat, upacara membangun rumah, dan sebagai penglaris dalam usaha dan bisnis agar lebih lancar dalam prosesnya .

Salah satu teknologi reproduksi yang dapat digunakan untuk efisiensi pejantan dalam meningkatkan populasi dan kualitas ayam cemani adalah dengan inseminasi buatan (Toelihere, 1993). Inseminasi buatan merupakan cara memasukkan spermatozoa kedalam organ reproduksi betina dengan *insemination gun*, suatu alat buatan manusia dan melalui proses sejak penampungan semen, penilaian, pengenceran semen, sampai penilaian hasil inseminasi buatan. Selama proses penyimpanan, spermatozoa memerlukan energi yang cukup, spermatozoa sering mengalami *cold shock* dan kerusakan oksidatif yang dapat menyebabkan penurunan daya hidup dan motilitas selama penyimpanan pada suhu dingin. Oleh karena itu dalam proses penyimpanan semen perlu dilakukan proses pengenceran dengan bahan pengencer yang mampu menanggulangi *cold shock* dan memenuhi kriteria diatas (Herdis *et al.*, 2002). Kuning telur dapat membantu spermatozoa

untuk menahan *cold shock*, mencegah kerusakan membran plasma spermatozoa selama penyimpanan pada suhu dingin (Amirat *et al.*, 2004).

Menurut Toelihere (1993), kuning telur mempunyai komponen berupa lipoprotein dan lesitin yang dapat mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein dari sel spermatozoa, selain itu juga mengandung fraksi *low density lipoprotein* (LDL) yang dapat mempertahankan dan melindungi spermatozoa dari cekaman dingin. *Phosphate Buffer Saline* (PBF) adalah larutan fisiologis yang bersifat isotonis dan tidak beracun terhadap sel serta menjaga kadar pH dan mempertahankan osmolaritas sel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh lama simpan semen ayam cemani dalam pengencer kuning telur dengan tambahan PBF pada suhu 4°C terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam cemani jantan yang sudah dewasa kelamin dan berumur sekitar delapan bulan sebagai sumber semen. Ayam diberi pakan, jagung dan konsentrat dengan perbandingan 1:1, kemudian air minum diberi secukupnya. Sebelum dilakukan penampungan semen, ayam diadaptasikan selama satu minggu. Pada tahap ini hewan dilatih untuk mengeluarkan semen dengan metode pemijatan. Teknik penampungan semen pada ayam cemani dilakukan dengan menggunakan metode *massage* (metode pemijatan) pada bagian punggung ayam. Semen dari kedua pejantan dikumpulkan 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 kuning telur fosfat.

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), T6 (disimpan selama 72 jam) dengan pengulangan tiap perlakuan sebanyak empat kali. Jumlah sampel yang diperlukan dihitung berdasarkan rumus Federer yaitu $(t-1)(n-1) \geq 15$. Total jumlah sampel yang digunakan sebanyak 28 sampel.

Teknik Penampungan Semen

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

Pembuatan Pengencer Kuning Telur Fosfat

Pengencer fosfat kuning telur dibuat dengan cara melarutkan satu tablet buffer fosfat (Buffer Fosfat Saline, Sigma®) ke dalam 100 mL aquades dan dilakukan pasteurisasi dengan suhu 60°C - 100°C di atas kompor listrik selama 10 menit sambil diaduk agar homogen, kemudian didinginkan. 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 diatas kertas saring steril kemudian kuning telur ditempatkan pada gelas Beker dan dilakukan tusukan pada kuning telur agar pecah. Setelah larutan PBS dingin, diambil larutan PBS 10 mL yang kemudian ditambahkan dengan 10 mL kuning telur. Ditambahkan pula antibiotik 1000 IU/mL ke dalam pengencer kuning telur dan juga streptomycin 1 mg/mL lalu dihomogenkan.

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 menggunakan spuit dan diletakan pada *object glass*, kemudian ditutup dengan *cover glass*. Pengamatan menggunakan 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 negrosin. Satu tetes semen yang telah diencerkan, diletakan pada *object glass* kemudian ditambahkan dengan satu tetes cairan pewarna eosin negrosin lalu dihomogenkan. Selanjutnya

dibuat preparat ulas dengan cara menekan dan mendorong *object glass* membentuk sudut 45° dan dikeringkan. Lalu diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna merah karena permeabilitas dinding selnya telah melemah sedangkan spermatozoa yang hidup akan terlihat transparan (Toelihere, 1993).

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) dengan aplikasi SPSS versi 25 *for windows*. Data yang berbeda secara bermakna antar perlakuan akan mendapat analisis lanjutan menggunakan uji Duncan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

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

Tabel 1. Gambaran mikroskopis dan makroskopis semen segar ayam cemani

Pemeriksaan	Hasil
Semen Makroskopis	
Volume (mL)	0,5
Warna	Putih
pH	7,4
Konsistensi	Kental
Bau	Spesifik
Semen Mikroskopis	
Gerakan Massa	+++ (Gerak Progresif)
Motilitas Progresif (%)	88
Konsentrasi (10^6)	5027
Sperma Hidup (%)	95
Abnormalitas	9

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa semen segar hasil penampungan sebagai materi penelitian layak digunakan untuk inseminasi buatan dengan jumlah volume 0,5 mL. Hasil yang didapatkan sesuai dengan pernyataan Garner dan Hafez (2000), bahwa ayam memiliki volume ejakulat rata-rata 0,2-0,5 mL.

Semen yang berkualitas baik seharusnya kental dan berwarna putih krem dengan bau yang spesifik (amis). Warna semen hasil evaluasi adalah putih krem dengan konsistensi kental dan konsentrasi 5027×10^6 mL, serta motilitas progresif 88%. 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 (Toelihere, 1993).

Pada penelitian ini di dapatkan pH 7,4. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Toelihere (1993), bahwa semen unggas memiliki pH antara 7,0-7,6. Derajat keasaman plasma semen sangat menentukan status kehidupan spermatozoa di dalam semen. Semakin tinggi atau semakin rendah pH semen akan menyebabkan spermatozoa lebih cepat mengalami kematian. 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 +++ yang artinya bergerak progresif, motilitas progresif 88%, daya hidup 95%, dan abnormalitas 9%. Sastrodihardjo dan Resnawati (1999) dan Solihati *et al.* (2006) menyatakan bahwa semen layak digunakan untuk IB bila memenuhi syarat persentase viabilitas diatas 45% dan motilitas individu diatas 40. Oleh karena itu semen yang digunakan sebagai materi penelitian layak untuk digunakan dan dapat diproses lebih lanjut.

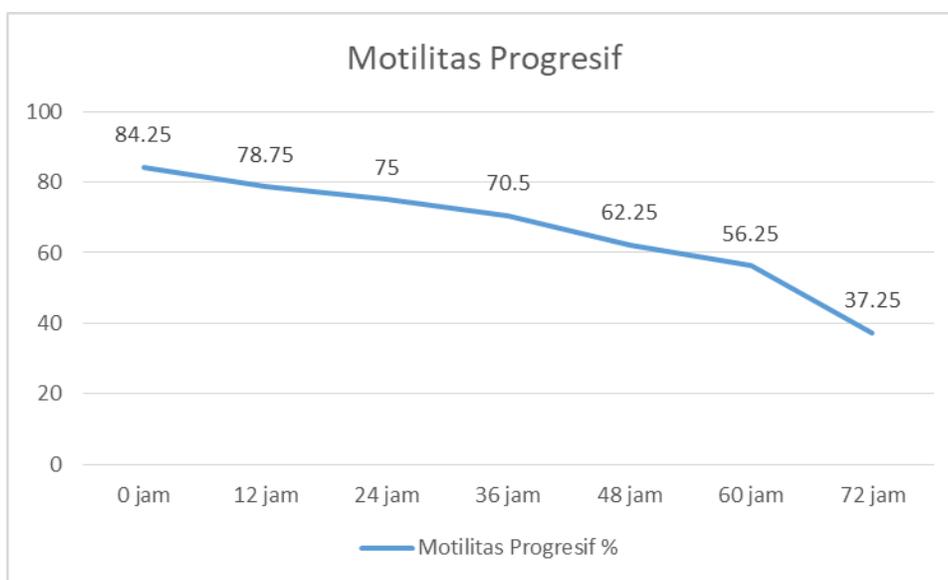
Tabel 2. Rata-rata motilitas progresif dan daya hidup spermatozoa ayam cemani pada pengencer kuning telur fosfat yang disimpan pada suhu 4°C

Lama Penyimpanan (T)	Motilitas Progresif (%)	Daya Hidup (%)
0 Jam	84,25±9,57 ^a	89±1,414 ^a
12 Jam	78,75±9,60 ^b	84,50±0,58 ^b
24 Jam	75±1,414 ^c	78,75±1,26 ^c
36 Jam	70,50±1,291 ^d	74,50±1,732 ^d
48 Jam	62,25±2,50 ^e	65±2,16 ^e
60 Jam	56,25±4,35 ^f	51,25±5,38 ^f
70 Jam	37,25±5,32 ^g	35±3,56 ^g

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa seiring bertambahnya waktu maka terjadi penurunan terhadap motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani dalam pengencer fosfat kuning telur pada suhu 4°C. Pada penelitian ini penyimpanan semen ayam cemani pada pengencer kuning telur fosfat menghasilkan motilitas spermatozoa yang layak untuk diinseminasikan adalah semen pada jam ke – 0, 12, 24, 35, 48, 60. Semen yang disimpan selama 60 jam memiliki rataan motilitas 56,25 %. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Solihati (2006) bahwa motilitas terendah yang harus dimiliki semen untuk melakukan inseminasi buatan adalah 40%. 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. Semakin lama waktu penyimpanan menyebabkan tingkat penurunan pH juga semakin besar karena selama penyimpanan proses metabolisme spermatozoa terus berlangsung baik secara aerob dan anaerob. Motilitas (daya gerak) spermatozoa sangat bergantung pada suplai energi berupa *adenosine triphosphate* (ATP) hasil metabolisme (Danang *et al.*, 2012).

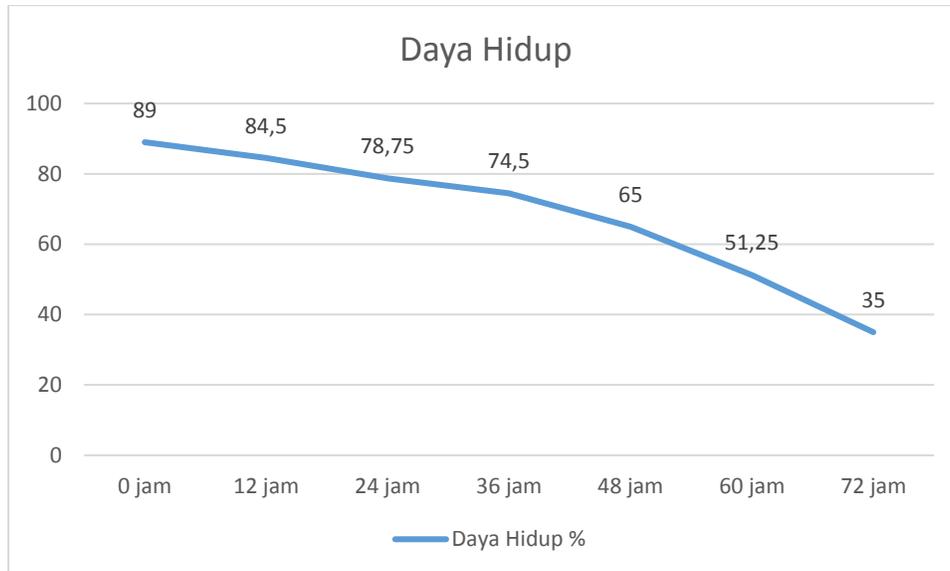
Grafik presentase rata-rata motilitas progresif spermatozoa ayam cemani dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Persentase rata-rata motilitas progresif spermatozoa ayam cemani

Semen yang layak digunakan untuk inseminasi buatan harus memenuhi syarat persentase daya hidup diatas 45% (Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999). Pada penelitian ini didapatkan daya hidup semen sebesar 51,25% setelah 60 jam. 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.

Grafik mengenai persentase rata-rata daya hidup spermatozoa ayam cemani dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Persentase rata-rata daya hidup spermatozoa ayam cemani

Daya hidup spermatozoa ayam cemani dalam pengencer kuning telur fosfat lebih baik diantara berbagai perlakuan. Komponen spesifik kuning telur yang bertanggung jawab sebagai agen krioprotektif ialah lesitin, fosfolipid, ekstrak lipid, fraksi lipoprotein dan lipoprotein spesifik (Gazali dan Tambing, 2002). Kandungan lesitin (*phosphatidil choline*) pada kuning telur dapat bersifat membran *couiting* untuk tetap mempertahankan konfigurasi normal *phospholipid bilayer* yang merupakan susunan utama membran sel spermatozoa. Kuning telur mengandung LDL yang berfungsi menjaga stabilitas membran sel dan membran akrosom, 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). Faktor yang mempengaruhi daya hidup spermatozoa adalah suhu penyimpanan, ketersediaan nutrisi yang dibutuhkan untuk spermatozoa untuk melakukan aktivitas dan metabolisme, dan lama penyimpanan. Semakin lama waktu penyimpanan menyebabkan penurunan jumlah vitamin A yang mampu mengikat radikal bebas, sehingga menyebabkan electron radikal bebas berikatan dengan membran plasma sel dan menyebabkan kebocoran membran plasma sel. Metabolisme sel akan berlangsung baik jika membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga

mampu dengan baik mengatur lalu lintas masuk dan keluar dari sel semua substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme pada sel.

Daya hidup spermatozoa dapat bertahan sampai 60 jam disebabkan karena penyimpanan pada suhu rendah membuat proses metabolisme berjalan lambat sehingga produksi radikal bebas yang dihasilkan dari proses metabolisme tersebut juga tidak terlalu cepat. Pemeriksaan daya hidup spermatozoa dilakukan dengan pewarnaan *oeosin-negrosin*. Spermatozoa yang mengalami kerusakan pada membran plasma akan menyebabkan sifat semipermeabilitasnya hilang. Membran plasma tidak lagi mampu menyeleksi keluar masuknya zat dikarenakan tekanan osmotik, sehingga pada saat dilakukan uji warna *eosin-negrosine*, zat eosin tersebut masuk ke dalam plasma dan menyebabkan spermatozoa berwarna merah. Hal ini membuat spermatozoa menyerap larutan pewarna eosin sebagai tanda spermatozoa telah mati akibat meningkatnya permeabilitas membran sel (Toelihere, 1993).

Bahan pengencer kuning telur fosfat dibuat dari larutan *Phosphate Buffer Saline* yang merupakan larutan fisiologis yang bersifat isotonis dan tidak beracun terhadap sel, membantu agar pH dan tekanan osmosis tetap stabil sehingga tidak menyebabkan penurunan aktivitas spermatozoa. Yulnawati dan Setiadi (2005) menjelaskan bahwa spermatozoa yang mati dan berubah menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga menyebabkan kualitas spermatozoa secara umum menurun. 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 berhasil melakukan penyimpanan yang lebih lama dibandingkan dengan penyimpanan semen ayam kampung (Mayedesta *et al.*, 2014), pada kalkun (Atmaja *et al.*, 2014), dan pada ayam hutan hijau (Laksmi *et al.*, 2013). Semakin lama penyimpanan maka mengakibatkan semakin menurunnya motilitas progresif dan daya hidup. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian pada penyimpanan semen ayam magon dalam pengencer *Ringer's Lactat* (Fitriyah dan Suryanto, 2019), pada spermatozoa ayam yang disimpan dalam pengencer glukosa kuning telur fosfat (Mayesta, 2014), pada ayam kampung dalam pengencer *Ringer's Lactat*

(Danang, 2012). Penyimpanan semen yang lebih lama akan menurunkan motilitas dan daya hidup spermatozoa.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka dapat disimpulkan bahwa lama penyimpanan semen ayam cemani dalam pengencer kuning telur fosfat dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa dengan lama penyimpanan sampai 60 jam pada suhu penyimpanan 4°C dengan motilitas 56,25 % dan daya hidup 51,25 % yang memenuhi angka standar untuk pelaksanaan inseminasi buatan.

SARAN

Pelaksanaan inseminasi buatan pada ayam cemani dengan pengencer kuning telur fosfat disimpan pada suhu 4°C sebaiknya dilakukan tidak lebih dari 60 jam setelah penampungan, agar mendapatkan hasil yang optimal dalam menunjang keberhasilan inseminasi buatan

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

- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L. 2004. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk ldl: a 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, 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.
- 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.
- Fitriyah NH, Suryanto D. 2019. Pengaruh lama penyimpanan semen dalam pengencer ringer's

- lactat yang disimpan pada suhu 4⁰C terhadap kualitas spermatozoa ayam magon. *Jurnal Rekasatwa Peternakan* 1(1): 28-37
- Garner DL, Hafez ESE. 2000. *Spermatozoa and seminal plasma*. In Reproduction in farm Animals 7th. Philadelphia. Blackwell Publishing. Hlm. 96-125.
- Gazali M, Tambing SN. 2002. Kriopreservasi sel spermatozoa. *Hayati*. 9(1): 27-32.
- Herdis, Kusuma I, Surachman M, Riza M, Utama IK, Inounu I, Purwantara B, Arifiantini I. 2002. Peningkatan kualitas semen beku domba garu melalui penambahan a-tokoferol ke dalam pengencer susu-skim kuning telur. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 7(1): 12-17.
- Iskandar S. 2006. Pelestarian plasma nutfah ayam lokal domestik. *Warna Penelitian dan Pengembangan Pertanian* 28 (3): 11- 13.
- Laksmi DNDI, Bebas W, Budiasa MK. 2013. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam kampung dengan penambahan astaxanthin. *Indonesia Medicus Veterinus* 2(4): 445- 452.
- 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.
- Mayesta DDM, Trilaksana IGNB, Bebas W. 2014. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam dalam pengencer glukosa kuning telur fosfat pada penyimpanan 3-5⁰C. *Indonesia Medicus Veterinus* 3(1): 43-52.
- 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.
- Wardani IK, Koesnoto S, Hidanah S. 2014. Pengaruh sistem manajemen terhadap kelayakan usaha peternakan ayam cemani di desa kedu kecamatan kedu kabupaten temanggung. *Jurnal Agroveteriner* 2(2): 131-138.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas dan keutuhan membran plasma spermatozoa epididimis kucing selama penyimpanan pada suhu 4⁰C. *Media Kedokteran Hewan* 21(3): 100-104.
- Yang R, Li J, Zhao XZ, Peng XW, Song XQ, Yang JL. 2012. Effect of egg yolk added to goose semen extender on the semen survival time. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 10(2): 491-492.