

## **Daya Simpan Semen Ayam Cemani dalam Pengencer Susu Skim Fosfat pada Suhu 4°C Berdasarkan Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa**

*(STORABILITY OF CEMANI COCK SEMEN IN PHOSPHATE SKIM MILK DILUENT AT 4°C BASED ON MOTILITY AND VIABILITY OF SPERMATOZOA)*

**Josephine Aurora Budi<sup>1</sup>,  
Wayan Bebas<sup>2</sup>, Desak Nyoman Dewi Indira Laksmi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mahasiswa Pendidikan Sarjana Kedokteran Hewan,  
<sup>2</sup>Laboratorium Reproduksi Veteriner,  
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana  
Jl. Sudirman, Sanglah, Denpasar, Bali, Indonesia 80234,  
Telp/Fax: (0361) 223791  
e-mail: josephine.aurora@yahoo.co.id

### **ABSTRAK**

Penelitian bertujuan untuk mengetahui motilitas dan daya hidup spermatozoa yang disimpan dalam pengencer susu skim fosfat pada suhu 4°C. Semen ayam cemani diencerkan dengan perbandingan 1:25 dan disimpan dalam suhu 4°C, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali pada jam ke-0, 12, 24, 36, 48, 60, dan 72 jam. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), data yang diperoleh diuji dengan sidik ragam dan uji Duncan. Motilitas spermatozoa diamati dengan melihat pergerakan progresifnya dan dihitung dalam satuan persen, sedangkan daya hidup spermatozoa diamati dengan pengecatan *eosin negrosin citrate*. Spermatozoa yang hidup akan terlihat bening dan yang mati berwarna merah. Hasil dari uji tersebut menunjukkan motilitas dan daya hidup spermatozoa mengalami penurunan selama penyimpanan. Motilitas semen spermatozoa disimpan selama 48 jam pada suhu 4°C adalah 44%. Daya hidup spermatozoa selama penyimpanan semen 48 jam pada suhu 4°C adalah 45,75%, hal itu sesuai dengan standar minimal untuk inseminasi buatan. Semen ayam cemani dapat disimpan sampai dua hari pada suhu 4°C dengan pengencer susu skim fosfat.

Kata-kata kunci: ayam cemani; semen; susu skim fosfat; motilitas; daya hidup

### **ABSTRACT**

The aim of this study is to determine the motility and viability of cemani cock spermatozoa stored in phosphate skim milk diluent stored at temperature of 4°C. Cemani cock semen is diluted with a ratio of 1:25 and stored at 4°C, then observed using a light microscope with magnification 400 times at 0, 12, 24, 36, 48, 60, and 72 hours. This research using Completely Randomized Design (CRD), the data obtained are tested with analysis of variance and Duncan test. The result of these test showed that spermatozoa motility and viability decreased during storage. Spermatozoa motility observed by looking at movement of progressive and calculated in percent unit. While spermatozoa viability observed with eosin negrosin citrate. Spermatozoa that stays alive will have no colour or clear and dead spermatozoa will coloured red. In this research, cemani cock semen storage using phosphate skim milk diluent is able to maintain the quality of spermatozoa. The result showed motility of spermatozoa during storage period of 48 hours was 44%. Meanwhile, the viability of spermatozoa in storage period 48 hours was 45,75%. This is in

accordance with the minimum standar for artificial insemination. Cemani cock semen can be stored for up to two days at 4°C with phosphate skim milk diluent.

Keywords: cemani cock; semen; phosphate skimmed milk; motility; viability

## PENDAHULUAN

Keanekaragaman genetik plasma nutfah ayam lokal di Indonesia cukup melimpah dan sangat beragam (Daryono *et al.*, 2010). Ayam lokal Indonesia merupakan ayam asli Indonesia yang didomestikasi dan dikembangkan membentuk suatu rumpun (Untari *et al.*, 2013). Nataamijaya (2000) menyatakan terdapat 31 rumpun ayam lokal Indonesia yang mempunyai ciri khas sehingga ayam lokal banyak dipelihara/diternakkan. Ayam cemani adalah salah satu ayam lokal yang memiliki potensi tinggi untuk dikembangkan.

Ayam cemani merupakan jenis dari ayam kedu yang 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 (Muryanto *et al.*, 1993). Nilai ekonomis ayam cemani lebih tinggi dibandingkan dengan ayam kedu biasa, karena diminati sebagai peliharaan ayam hias. Hal ini meningkatkan minat peternak untuk menekuni budidaya ayam cemani, karena ayam ini mempunyai permintaan pasar yang cukup terbuka (Wardani dan Keosnoto, 2014). Inseminasi buatan merupakan salah satu teknologi reproduksi yang dapat dilakukan untuk efisiensi pejantan cemani dan meningkatkan populasi.

Inseminasi buatan pada unggas selama ini hanya menggunakan semen segar dengan atau tanpa bahan pengencer (Toelihere, 1993). Kemampuan daya hidup semen, motilitas semen, dan bahan pengencer memengaruhi keberhasilan inseminasi buatan. Upaya untuk mempertahankan daya fertilitas semen secara optimum salah satunya bisa dilakukan dengan menyimpan semen pada suhu 4°C, hal ini bertujuan untuk menghambat aktivitas metabolisme baik secara fisik maupun kimiawi dalam kecepatan yang rendah (Danang *et al.*, 2012). Menurut Hjaardinto (1991), bahan pengencer yang baik digunakan untuk semen ayam yaitu memiliki harga yang relatif murah, mudah didapat dan efektif untuk pengenceran dan penyimpanan serta isotonis. Salah satu bahan pengencer yang memenuhi persyaratan tersebut yang dianggap baik untuk kebutuhan inseminasi buatan adalah larutan *phosphate buffer saline* (PBF). Pengencer semen diperlukan nutrisi untuk pertumbuhan spermatozoa. Salah satu nutrisi dalam bahan pengencer yang baik adalah gula. Susu

skim merupakan bahan yang baik sebagai pengencer karena mudah didapatkan dan mengandung banyak gula. Gula baik monosakarida, disakarida maupun polisakarida dapat berfungsi sebagai krioprotektan ekstraseluler yang berperan dalam melindungi spermatozoa selama proses penyimpanan pada suhu dingin (Rizal *et al.*, 2003), mempertahankan tekanan osmosis larutan pengencer dan sebagai sumber energi bagi spermatozoa selama inkubasi pada proses penyimpanan (Yildiz *et al.*, 2000). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani yang disimpan dalam pengencer susu skim fosfat pada suhu 4°C.

### **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini menggunakan dua ekor ayam cemani jantan berumur delapan bulan sebagai sumber semen. Ayam diadaptasikan selama satu minggu sebelum dilakukan penampungan semen. Semen dari kedua pejantan dikumpulkan kemudian dihomogenkan dan dilakukan pemeriksaan secara makroskopis (volume, pH, bau, konsistensi) dan mikroskopis (gerakan massa, gerakan individu, dan konsentrasi). Semen yang telah diketahui kualitasnya kemudian diencerkan dengan pengencer susu skim fosfat dengan perbandingan 1:25 yang didapat dari rumus. Jumlah pengencer (mL) =  $(\text{Volume semen} \times \text{konsentrasi motilitas}) \times (100.000.000/0,5 (\text{dosis straw IB}))^{-1}$ .

Penelitian dilakukan dengan rancangan penelitian RAL dengan tujuh perlakuan (Atmajaya, 2014) yaitu T0 atau kontrol (disimpan pada 0 jam), T1 (disimpan pada 12 jam), T2 (disimpan pada 24 jam), T3 (disimpan pada 36 jam), T4 (disimpan pada 48 jam), T5 (disimpan pada 60 jam), T6 (disimpan pada 72 jam) dengan pengulangan tiap perlakuan sebanyak empat kali. 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 dengan empat ulangan, sehingga diperoleh perhitungan  $(7-1)(n-1) \geq 15$ , sehingga total jumlah sampel sebanyak 28 sampel.

#### **Teknik Penampungan Semen**

Teknik penampungan semen pada ayam cemani dilakukan dengan menggunakan metode *massage* (metode pemijatan) pada bagian punggung ayam. Penampungan sebaiknya dilakukan oleh dua orang (Suprijatna *et al.*, 2005), satu orang memegang ayam dan melakukan pemijatan, sedangkan satu orang lagi melakukan penampungan semen. Pemijatan dilakukan dengan cara

tangan membentuk sudut 45° pada tulang punggung ayam pejantan. Semen yang keluar ditampung pada cawan petri dan dihindari dari kontaminasi oleh kotoran (Sastrodiharjo dan Resnawati, 1999).

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

Satu tablet buffer fosfat dilarutkan ke dalam 100 mL aquadestilata dengan perbandingan 10:1, dan dipasteurisasi selama 10 menit kemudian didinginkan. Larutan PBS sebanyak 10 mL yang telah dingin, dicampurkan dengan 10 mL susu skim, tambahkan antibiotik penicillin 1000 IU/mL pengencer dan streptomycin 0,1 mg/mL pengencer.

### **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**

Semen yang telah diencerkan yang diambil menggunakan spuit dan diletakan pada *object glass* kemudian ditutup dengan *cover glass* dan diamati dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali untuk menghitung persentase jumlah spermatozoa yang bergerak progresif (Toelihere, 1993).

### **Pengamatan Daya Hidup Spermatozoa**

Persentase hidup spermatozoa ditentukan dengan metode pewarnaan Eosin Negrosin. Satu tetes semen yang telah diencerkan, diletakan pada *object glass* kemudian ditambahkan dengan cairan pewarna Eosin Negrosin, selanjutnya dibuat preparat ulas dengan cara menekan dan mendorong dengan menggunakan *object glass* lain, membentuk sudut 45° dan dikeringkan. Amati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna merah karena permeabilitas dinding selnya telah melemah (Toelihere, 1993).

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan sidik ragam dan perbedaan yang bermakna antar perlakuan, dilanjutkan menggunakan uji jarak berganda Duncan. Penghitungan statistika dilakukan dengan menggunakan SPSS versi 25 *for windows*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari 2020 di Laboratorium Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan semen secara makroskopis dan mikroskopis sebelum diencerkan diperoleh data seperti disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Gambaran mikroskopis dan makroskopis semen ayam cemani

Pemeriksaan	Hasil Pengamatan
<b>Makroskopi</b>	
Volume (mL)	0,5
Warna	Putih
pH	8,7
Konsistensi	Kental
Bau	Spesifik
<b>Mikroskopis</b>	
Gerakan Massa	+++
Motilitas Progresif (%)	86
Konsentrasi ( $10^6$ )	5027
Sperma Hidup (%)	95
Abnormalitas (%)	3
Daya Hidup (%)	90

Pada Tabel 1 teramati bahwa semen segar yang digunakan sebagai materi penelitian layak digunakan untuk inseminasi buatan dengan volume 0,5 mL. Menurut Johari (2009), volume semen unggas berkisar 0,3-1 mL dan kualitas semen yang baik seharusnya kental dan berwarna putih krem dengan bau yang spesifik (amis).

Hasil pengukuran pH semen ayam cemani pada penelitian ini adalah 7,4. Semen unggas memiliki pH yang bersifat basa dengan variasi 7,0-7,6 (Lubis, 2011). Derajat keasaman (pH) semen dipengaruhi dari proses metabolisme spermatozoa dalam keadaan anaerobik dan sangat berpengaruh terhadap daya hidup spermatozoa. Hasil dari proses metabolisme adalah asam laktat yang mampu menurunkan pH semen yang akhirnya menyebabkan kematian sel spermatozoa (Toelihere, 1993).

Spermatozoa harus memiliki motilitas dan daya hidup yang tinggi untuk menunjang pelaksanaan dan keberhasilan inseminasi buatan. Hasil semen ayam cemani yang telah dievaluasi

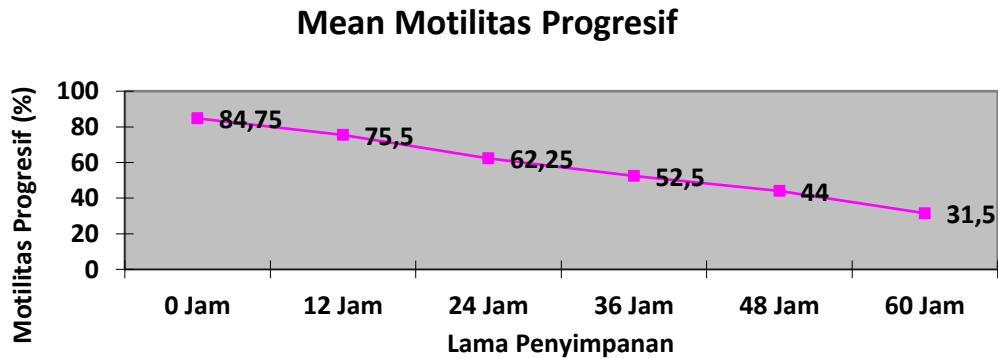
dalam penelitian ini memiliki pergerakan massa semen dengan nilai +++, motilitas progresif 86%, daya hidup 95%, dan abnormalitas 3%, hal ini menunjukkan bahwa semen tersebut layak untuk inseminasi buatan. Sastrodihardjo dan Resnawati (1999) menyatakan bahwa semen layak digunakan untuk teknik IB bila memenuhi syarat persentase viabilitas di atas 45% dan motilitas individu di atas 40% (Solihati *et al.*, 2006; Sastrodihardjo dan Resnawati, 1999).

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

Lama Penyimpanan (T)	Motilitas Progresif (%)	Daya Hidup (%)
0 Jam	84,75±1,25 <sup>a</sup>	84,25±3,30 <sup>a</sup>
12 Jam	75,5±4,20 <sup>b</sup>	73,75±2,98 <sup>b</sup>
24 Jam	62,25±2,21 <sup>c</sup>	59,25±2,98 <sup>c</sup>
36 Jam	52,5±2,08 <sup>d</sup>	51,25±1,5 <sup>d</sup>
48 Jam	44±1,14 <sup>e</sup>	45,75±1,70 <sup>e</sup>
60 Jam	31,5±2,38 <sup>f</sup>	35,5±3,10 <sup>f</sup>

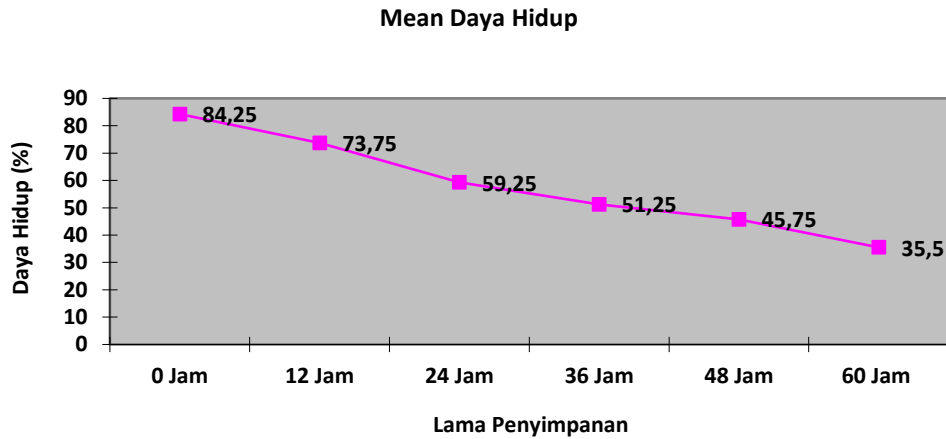
Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05).

Grafik mengenai persentase rata-rata motilitas progresif spermatozoa ayam cemani disajikan pada Gambar 1.



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

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



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

Persentase rata-rata motilitas spermatozoa pada Gambar 1, mengalami penurunan yang sangat nyata. Persentase motilitas tertinggi didapatkan pada jam ke-0 dengan nilai 84,75%, dan nilai terendah pada jam ke-60 yaitu 31,5%, sedangkan persentase rata-rata daya hidup spermatozoa (Gambar 2) menurun dari 84,25% hingga 35,5%. Kedua grafik menunjukkan penurunan yang signifikan selama proses penyimpanan semen.

Penyimpanan semen ayam cemani dengan pengencer susu skim fosfat pada penelitian ini menghasilkan motilitas spermatozoa yang layak untuk diinseminasikan yaitu semen pada jam ke-0 hingga 48. Semen yang disimpan selama 48 jam memiliki rataan motilitas 44%. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Solihati (2006) bahwa motilitas terendah yang harus dimiliki semen untuk bisa digunakan dalam inseminasi buatan 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 persediaan 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 45,75% setelah 48 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.

Pengencer susu skim fosfat mengandung laktosa dan vitamin dalam buffer yang stabil. Laktosa dimetabolisme oleh sel spermatozoa menghasilkan 36 ATP + 3 elektron negatif, sehingga energi ATP tersebut digunakan untuk aktivitas spermatozoa, sedangkan tiga elektron negatif yang bersifat radikal bebas dikeluarkan dari sel dan diubah oleh vitamin B<sub>12</sub> dalam susu (Arini *et al.*, 2019). Semakin lama waktu penyimpanan menyebabkan penurunan jumlah vitamin yang mampu mengikat radikal bebas, sehingga menyebabkan elektron 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.

Daya hidup spermatozoa dapat bertahan sampai 48 jam karena penyimpanan pada suhu rendah membuat proses metabolisme berjalan lambat sehingga produksi radikal bebas yang dihasilkan dari proses metabolisme tersebut juga tidak terlalu cepat. Daya hidup spermatozoa diperiksa dengan pewarnaan *eosin-negrosin*. Spermatozoa yang mengalami kerusakan pada membran plasma akan menyebabkan sifat semipermeabilitasnya tidak mampu lagi menyeleksi keluar masuknya zat, sehingga pada saat dilakukan uji warna *eosin-negrosine*, zat eosin tersebut masuk ke dalam plasma dan menyebabkan spermatozoa berwarna merah. Hal ini menunjukkan spermatozoa yang menyerap larutan pewarna eosin sebagai tanda spermatozoa telah mati akibat meningkatnya permeabilitas membrane sel (Toelihere, 1993).

Bahan pengencer susu skim fosfat dibuat dari larutan *buffer phosphate 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. Susu skim mengandung laktosa sebagai sumber makanan yang digunakan spermatozoa untuk menghasilkan ATP. Spermatozoa yang mati dan menjadi toksik terhadap spermatozoa lain yang masih hidup, sehingga menyebabkan kualitas spermatozoa secara umum menurun (Yulnawati dan Setiadi, 2005; Soler, 2003). Bahan pengencer yang mengalami oksidasi



dapat merusak keutuhan membran plasma spermatozoa karena penyimpanan yang lama menyebabkan tingginya kadar radikal bebas.

Hasil penelitian ini mendapatkan hasil penyimpanan spermatozoa yang kemudian dibandingkan dengan penelitian Danang *et al.* (2012), yang menyimpan spermatozoa ayam kampung dalam pengencer *Ringer's* pada suhu 4 °C, dan digunakan untuk inseminasi buatan dalam waktu tidak lebih dari 18 jam setelah penampungan. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian pada penyimpanan semen ayam magon dalam pengencer *Ringer's Lactat* (Fitriyah, 2019), pada spermatozoa ayam yang disimpan dalam pengencer glukosa kuning telur fosfat (Mayesta, 2014), pada ayam kampung dalam pengencer *Ringer's Lactat* (Danang *et al.*, 2012). Penyimpanan semen yang lebih lama akan menurunkan motilitas dan daya hidup spermatozoa.

### **SIMPULAN**

Hasil penelitian dapat disimpulkan lama penyimpanan semen ayam cemani dengan pengencer susu skim fosfat pada suhu 4°C dapat mempertahankan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Motilitas dan daya hidup spermatozoa ayam cemani dalam pengencer susu skim fosfat yang disimpan selama 48 jam dengan suhu penyimpanan 4°C mendapatkan persentase motilitas 44% dan daya hidup 45,75%.

### **SARAN**

Semen ayam cemani yang diencerkan dengan susu skim fosfat disimpan pada suhu 4°C tidak lebih dari 48 jam, agar mendapatkan hasil yang optimal dalam menunjang keberhasilan inseminasi buatan pada unggas.

### **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**

- Arini MA, Suprayogi TW, Warsito SH, Sardjito T, Susilowati S, Triana IN. 2019. Peranan Vitamin B12 dalam Pengencer Susu Skim Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Sapudi Post Thawing. *Ovozoa* 8(2): 110-115.
- Atmajaya, 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.
- 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.
- Daryono BS, Iwan R, Hendry TSS. 2010. Pewarisan Karakter Fenotip Ayam Persilangan Ayam Pelung dengan Ayam Cemani. *Jurnal Veteriner* 11(4): 157-163.
- Fitriyah, Humaidah N, Suryanto D. 2019. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen dalam Pengencer Ringer's Lactat yang Disimpan Pada Suhu 4 °C Terhadap Kualitas Spermatozoa Ayam Magon. *Jurnal Rekasatwa Peternakan* 1(1): 28-37.
- Hardijanto. 1991. *Inseminasi Buatan pada Unggas*. Surabaya. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Johari S, Sutopo, Santi A. 2009. Frekuensi Fenotipik Sifat-Sifat Kualitatif Ayam Kedu Dewasa. *Seminar Nasional Kebangkitan Peternakan*: Hlm. 606-616.
- 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 DG, 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. 2000. The Native Chicken of Indonesia. *Buletin Plasma Nutfah* 6(1): 1-6.
- Rizal M, Toelihere MR, Yusuf TL, Purwantara B, Situmorang P 2003. Kriopreservasi Semen Domba Garut dalam Pengencer Tris dengan Konsentrasi Laktosa yang berbeda. *Media Kedokteran Hewan* 19(2): 79-83.
- Sastrodihardjo S, Resnawati H. 1999. *Inseminasi Buatan pada Ayam Buras*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Soler AJ, Guzman MDP, Garde JJ. 2003. Storage of Red Deer Epididymides for Four Days at 5°C: Effects on Sperm Motility, Viability, and Morphology Integrity. *Journal Exp. Zool* 295A: 188-199.
- 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.
- Suprijatna E, Atmomarsono U, Kartasudjana R. 2005. *Ilmu Dasar Ternak Unggas*. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Toelihere MR. 1993. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Bandung. Angkasa.
- Untari EK, Ismoyowati, Sukardi. 2013. Perbedaan Karakteristik Tubuh Ayam Kedu Yang Dipelihara Kelompok Tani Ternak Makukuhan Mandiri di Temanggung. *Jurnal Pembangunan Pedesaan* 13(2): 135-145.

- Wardani IK, Koesnoto SS. 2014. Pengaruh Sistem Manajemen Terhadap Kelayakan Usaha Peternakan Ayam Cemani Di Desa Kedu Kecamatan Kedu Kabupaten Temanggung. *Jurnal Agroveteriner* 2(2): 131-138.
- Yildiz CA, Aksoy KM, Tekeli T. 2000. Influence of Sugar Supplementation of the Extender on Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Dog Spermatozoa During Freezing. *Theriogenology* 54: 579-585.
- Yulnawati, Setiadi MA. 2005. Motilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kucing Selama Penyimpanan pada Suhu 4 °C. *Jurnal Unair* 21(3): 100-104.