

**PERANAN VITAMIN B12 DALAM PENGECER SUSU SKIM KUNING
TELUR TERHADAP MOTILITAS DAN VIABILITAS
SPERMATOZOA DOMBA SAPUDIPOST THAWING**

**THE ROLE OF VITAMIN B12 IN THE EGG YOLK SKIM MILK EXTENDER
TOWARDS THE MOTILITY AND VIABILITY OF POST THAWING
SAPUDI SHEEP SPERMATOZOA**

**Mirza Asafaizh Arini¹⁾, *Tri Wahyu Suprayogi²⁾, Sunaryo Hadi Warsito³⁾,
Trilas Sardjito⁴⁾, Suherni Susilowati⁵⁾, Indah Norma Triana⁶⁾**

¹⁾Student, ^{2,4,5,6)}Departement of Veterinary Reproduction, ³⁾Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga

*Corresponding author: email: twsuprayogi@gmail.com; mirzaasafaizh@gmail.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to prove that the addition of Vitamin B12 in egg yolk skim milk extender can maintain the motility and viability of post thawing Sapudi sheep spermatozoa. This study used sample of Sapudi sheep fresh semen that was collected with artificial vagina, and divided into 3 different treatments. The control treatment or P0, Sapudi sheep semen was diluted in the egg yolk skim milk extender + vitamin C 0,02 mg / ml, treatment group (P1 and P2), Sapudi sheep semen was diluted in the egg yolk skim milk extender+ vitamin B12 5 µg / ml and grouped in P1, Sapudi sheep semen was diluted in the egg yolk skim milk extender + Vitamin C 0.02 mg / ml + Vitamin B12 5µg / ml and grouped in P2. The data analysis was use One Way Analysis of Variant (ANOVA), then to identify the real difference among the treatments continued with Duncan distance test. The result of data analysis showed that P2 treatment was significantly different ($p < 0.05$) with P1 treatment and P0 treatment or control. While P1 treatment was not significantly different ($p > 0,05$) with P0 treatment or control. The result showed that the addition of vitamin C 0.02 mg / ml with vitamin B12 5 µg / ml combination in egg yolk skim milk extender was the best addition to maintain the motility and viability of the post thawing Sapudi sheep spermatozoa.

Keyword :Sapudi sheep spermatozoa, egg yolk skim milk extender, vitamin B12, motility, viability.

Pendahuluan

Domba merupakan salah satu jenis ternak yang banyak dipelihara oleh masyarakat Indonesia. Secara umum, domba lokal di Jawa Timur didominasi oleh domba Sapudi. Domba Sapudi sangat cocok untuk diternakkan dan dipelihara karena domba ini tahan beradaptasi pada kondisi kering dan panas dimana penyimpanan cadangan tubuh dilakukan dibagian ekornya yang berlemak (Tiesnamurti dan Santiananda 2006).

Untuk menunjang keberhasilan usaha peternakan maka perlu meningkatkan produktivitas reproduksi ternak. Upaya peningkatan produktivitas reproduksi dapat dicapai dengan teknologi inseminasi buatan (IB) yang bertujuan untuk memanfaatkan potensi seekor pejantan unggul secara

maksimal (Pamungkas, 2009). Inseminasi buatan pada ternak domba di Indonesia saat ini belum banyak dilaporkan tingkat keberhasilannya pada kondisi lapangan namun di prediksi tingkat kebuntingannya masih di bawah 30% (Inounu, 2014).

Keberhasilan IB di lapangan tergantung kualitas semen yang digunakan. Semen yang umum digunakan pada teknologi IB adalah semen beku. Keuntungan menggunakan semen beku adalah untuk memperluas jangkauan distribusi semen dan memperpanjang umur penyimpanan semen tersebut (Hardijanto dkk., 2010).

Rendahnya angka fertilitas pada domba disebabkan karena spermatozoa domba lebih sensitif terhadap *cold shock* dibandingkan spesies lain (Muino-Blanco *et al.*,

2008).Hardijanto dkk. (2010) mengatakan bahwa kandungan kolesterol pada membran plasma spermatozoa domba dan kambing lebih sedikit dibanding sapi, semakin sedikit kandungan kolesterol pada membran sel akan menyebabkan spermatozoa mudah mengalami kerusakan karena fungsi kolesterol untuk mengatur fluiditas dan permeabilitas membran sel.

Proses pembekuan semen sangat rentan merusak struktur membran plasma spermatozoa itu sendiri. Menurut Gazali dan Surya (2002) kerusakan yang terjadi salah satunya adalah peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi karena adanya radikal bebas yang sangat reaktif bereaksi dengan asam lemak tak jenuh penyusun utama fosfolipid membran spermatozoa. Dengan sedikitnya jumlah kolesterol penyusun lipid membran pada spermatozoa domba, maka akan semakin mempermudah terjadinya kerusakan saat proses pembekuan semen domba yang mengakibatkan rendahnya motilitas dan viabilitas spermatozoa.

Kerusakan membran plasma semen akibat radikal bebas dapat dicegah dengan pemberian antioksidan dalam pengencer. Vitamin B12 adalah salah satu vitamin yang larut dalam air. Vitamin ini berfungsi sebagai koenzim dalam sintesis metionin (Juanchi *et al.*, 2000). Sintesis metionin dapat menghasilkan metilasi organ – organ fungsional seperti DNA, RNA, neurotransmitter, lipid, dan asam amino penyusun sel serta dapat mengurangi stress oksidatif yang dipicu oleh proses pembekuan dan meningkatkan kualitas semen (Banihani, 2017).

Selama ini pemberian antioksidan dalam pengencer semen menggunakan vitamin C. Vitamin C merupakan antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas. Setyaningsih (2012) mengatakan bahwa meningkatkan pemberian dosis vitamin C dalam pengencer akan menurunkan kualitas semen. Karena sifat vitamin C yang asam apabila ditambahkan dalam jumlah berlebih akan mempengaruhi pH pengencer menjadi asam, spermatozoa akan mati apabila kondisi lingkungan sekitarnya menjadi asam (Rizal dan Herdis, 2010).

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui peranan penggantian dan penambahan vitamin B12 dalam pengencer susu

skim kuning telur dibandingkan peranan vitamin C dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa domba Sapudi *post thawing*.

Metode Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen domba yang berasal dari pejantan domba Sapudi berumur 1,5 – 2 tahun. Penelitian ini dilaksanakan di Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, desa Tanjung kecamatan Kedamean kabupaten Gresik pada bulan Maret – Mei 2018.

Semen dikoleksi menggunakan vagina buatan dengan frekuensi penampungan satu kali seminggu/pejantan. Penelitian ini menggunakan satu kali ejakulat dan dibagi menjadi tiga perlakuan dan dilakukan enam kali ulangan. Segera setelah penampungan, semen dievaluasi secara makroskopis meliputi volume, warna, bau, konsistensi dan pH serta secara mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi spermatozoa, jumlah spermatozoa yang hidup atau mati dan abnormal. Hanya semen yang mempunyai gerakan massa $\geq++$ dan gerakan individu dan daya hidup spermatozoa $\geq 70\%$, abnormalitas $< 15\%$ dan konsentrasi > 2000 juta/ml digunakan dalam penelitian ini

Bahan pengencer yang digunakan adalah susu skim kuning telur yang dibuat sesuai prosedur yang diterapkan oleh Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Sebanyak 10% skim milk (Tropicana Slim) dilarutkan dengan aquadest, dipanaskan sampai suhu $90-92^{\circ}\text{C}$ selama 10 menit. Setelah dingin disaring dan ditambahkan pada kuning telur 5ml hingga volume akhir larutan 100 ml. Selanjutnya ditambahkan antibiotik (*Penicillin* 1000 IU/ml dan *Streptomycin* 1mg/ml) dan fruktosa 0,5% dan dinamakan larutan A. Pengencer semen beku adalah larutan B yang terdiri dari susu skim kuning telur yang telah diberi antibiotik dan fruktosa ditambahkan 10% gliserol dan 2% glukosa.

Semen yang memenuhi persyaratan dibagi dalam 3 kelompok perlakuan pengencer susu skim kuning telur. Semen yang diencerkan pada pengencer susu skim telur dengan penambahan vitamin C 0,02 mg/ml (P0); pengencer susu skim kuning telur

dengan penambahan vitamin B12 5µg/ml (P1); pengencer susu skim kuning telur dengan penambahan kombinasi Vitamin C 0,02 mg/ml dan Vitamin B12 5µg/ml (P2). Semen yang telah diencerkan didinginkan pada dalam *cool top* suhu 3-5°C selama 1 jam. Setelah itu dilakukan proses gliserolisasi dengan mencampur diluter B dengan diluter A yang dilakukan secara bertahap dan perlahan-lahan melalui dinding tabung dalam suhu 5°C selama 1 jam kemudian di-equilibrasikan pada suhu 5°C selama 1 jam. Proses selanjutnya adalah pemeriksaan *before freezing* dengan melihat motilitas dan viabilitas spermatozoa di bawah mikroskop dengan pembesaran berturut – turut 100 kali dan 400 kali. Spermatozoa dinyatakan layak dengan persentase motilitas dan viabilitas $\geq 55\%$. Setelah itu dikemas dalam *ministraw* 0,25 ml. Kemudian melakukan proses *pre freezing* dengan cara meletakkan *ministraw* 1-2 cm di atas permukaan N₂ cair selama 9 menit pada suhu -140°C, kemudian melakukan proses *freezing* dengan menenggelamkan *ministraw* ke dalam N₂ cair pada suhu -196°C (Susilowati dkk., 2010). *Thawing* semen beku domba menggunakan air hangat dengan suhu $\pm 37^\circ\text{C}$ selama 15 detik. Setelah itu dilakukan pemeriksaan kualitas semen meliputi persentase motilitas dan viabilitas. Motilitas spermatozoa diperiksa dengan cara menempatkan satu tetes semen yang telah diencerkan pada gelas objek yang hangat yaitu bersuhu 37°C ditutup dengan gelas penutup dan memeriksanya di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali. Penilaian motilitas ini berdasarkan pada arah gerak spermatozoa dinyatakan dalam persen (%) dan kecepatan gerak dari spermatozoa dinyatakan dengan angka. Jumlah spermatozoa yang hidup dihitung dengan meneteskan setetes kecil semen yang telah diencerkan pada gelas objek

yang bersih dan mencampurnya dengan setetes besar zat warna *eosin negrosin* sampai homogen. Pembuatan preparat ulas dengan *caraslide* dan memfiksasi di atas api. Pengamatan spermatozoa yang hidup dan mati dilakukan di bawah mikroskop dengan penghitungan minimal 100 spermatozoa dengan pembesaran 400 kali

Analisis Data

Data yang diperoleh disusun dalam satu tabel, selanjutnya perbedaan motilitas dan viabilitas dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance (ANOVA) One Way*, kemudian untuk mengetahui perbedaan yang nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak Duncan dengan program SPSS 22 *for windows* (Kusriningrum, 2008).

Hasil dan Pembahasan

1. Kualitas Semen Segar Domba Sapudi

Pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis semen segar domba Sapudi dilakukan untuk mengetahui kualitas dan kuantitas semen domba yang akan diproses menjadi semen beku. Hasil pemeriksaan semen segar domba Sapudi dapat dilihat pada tabel 1 dan 2.

Berdasarkan tabel 1 dan 2, semen segar domba Sapudi memiliki kualitas yang baik, sehingga layak diproses lebih lanjut dalam bentuk semen semen beku.

2. Pemeriksaan Persentase Motilitas Spermatozoa *Post Thawing*

Hasil pemeriksaan persentase motilitas spermatozoa domba Sapudi *post-thawing* setelah diberi perlakuan. Pada penelitian inimeninjau motilitas spermatozoa berdasarkan arah dan kecepatan gerak spermatozoa. Hasil pemeriksaan *post thawing motility* spermatozoa dapat dilihat dalam tabel 3.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Makroskopis Semen Segar Domba Sapudi.

Parameter	Ukuran
Volume (ml)	1,2 ± 0,160
Warna	Putih Krem
Bau	Khas
pH	6 – 7
Konsistensi	Kental

Keterangan : bau semen khas semen Domba Sapudi (prengus)

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Semen Segar Domba Sapudi.

Parameter	Ukuran
Konsentrasi (Juta/ml)	5.533 ± 890,2
Gerakan Individu (%)	87,5 ± 2,88
Gerakan Massa	+++
Kecepatan	3,5 ± 0,58
Viabilitas Spermatozoa (%)	93,3 ± 2,50
Abnormalitas (%)	6,98 ± 0,83

Keterangan : +++ = sangat baik. Jika terlihat gelombang – gelombang besar.tebal, banyak,dan aktif bergerak.

Peranan vitamin C dapat mengikat radikal oksigen yang terdapat dalam sel sehingga dapat mencegah terbentuknya peroksidasi lipid yang menghambat motilitas spermatozoa. Vitamin C dapat bereaksi langsung dengan radikal bebas yang reaktif larut dalam air. Reaksi pengikatan radikal bebas oleh asam askorbat berupa :

$R^\circ + AH \rightarrow RH + A^\circ$. Asam askorbat bereaksi dengan radikal bebas dengan mengikat elektron tak berpasangan dari radikal tersebut dan menghasilkan antioksidan tereduksi (A°), antioksidan tereduksi ini tidak memiliki cukup energi untuk menimbulkan reaksi radikal berbahaya (Nimse and Dilipkumar, 2015).

Produksi ROS yang berlebihan akan memulai reaksi rantai oksidasi yang merusak protein, lipid dan DNA spermatozoa (Asadpour *et al.*, 2012). Vitamin B12 merupakan antioksidan yang berfungsi sebagai koenzim dalam proses sintesis metionin. Enzim ini diperlukan untuk mensintesis metionin dari homosistein untuk melengkapi siklus S-adenosilmetionin (SAM). Dalam siklus ini, S-adenosilmetionin diubah menjadi S-adenosilhomosistein yang menghasilkan metilasi makromolekul fungsional utama dalam tubuh seperti DNA, RNA, neurotransmitter, lipid, protein, dan asam amino (Banihani, 2017). Penambahan gugus metil dalam makromolekul fungsional tersebut dapat mengatur aktivitas sel sehingga sel mengalami pematangan dan dapat melindungi diri dari radikal bebas.

Manzanarez and Gil (2010) menyatakan bahwa mekanisme potensial dari pemberian vitamin B12 salah satunya adalah menstimulasi fosforilasi oksidatif. Fosforilasi oksidatif merupakan lintasan metabolisme untuk menghasilkan energi berupa ATP (*Adenosine Tri Phosphate*). Dalam mekanisme ini vitamin B12 bekerja dengan memberikan transport elektron

dalam mitokondria sehingga terciptanya gradien konsentrasi proton (H^+) yang digunakan untuk sintesis ATP dalam fosforilasi oksidatif, ATP ini dibutuhkan spermatozoa untuk motilitas menuju sel telur betina.

Kedua reaksi antioksidan ini memberikan efek positif perlindungan ganda yang diberikan dari mekanisme kerja kedua vitamin ini dalam menangkal radikal bebas dan dalam pembentukan energi untuk motilitas menghasilkan persentase motilitas yang lebih tinggi. Hal ini dibuktikan dalam perlakuan P2 terjadi perbedaan yang nyata ($p < 0,05$) dibandingkan dengan P0 atau kontrol dan menunjukkan hasil *Post Thawing Motility* (PTM) lebih tinggi diantara P1 dan P0 atau kontrol.

Kecepatan gerakan individu spermatozoa domba Sapudi *post thawing* pada perlakuan P0, P1 dan P2 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$). Hasil pemeriksaan dari ketiga perlakuan tersebut menunjukkan rerata angka 3. Hasil ini menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa domba Sapudi *post thawing* berada di atas standar gerakan individu spermatozoa minimal skor 2 (Ditjennak, 2016).

3. Pemeriksaan Viabilitas Spermatozoa *Post Thawing*

Hasil pemeriksaan persentase viabilitas spermatozoa domba Sapudi *post-thawing* setelah diberi perlakuan dapat dilihat dalam tabel 4.

Reaksi berantai dari peroksidasi lipid dapat diputus dengan antioksidan vitamin C (asam askorbat). Asam askorbat merubah bentuk strukturnya menjadi radikal askorbat dengan memberikan satu elektronnya ke radikal peroksil untuk mengakhiri reaksi berantai peroksidasi lipid (Nimse and Dilipkumar, 2015). Reaksi penangkapan radikal peroksidasi lipid oleh

antioksidan: $\text{ROO}^\circ + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}^\circ$. Reaksi tersebut menghasilkan radikal askorbat (A°) namun tidak memiliki cukup energi untuk menimbulkan reaksi radikal berbahaya. Radikal askorbat ini dapat direduksi kembali menjadi asam askorbat atau dioksidasi menjadi asam dehidroaskorbat (Nimse and Di-lipkumar, 2015).

Vitamin B12 bekerja dengan memberi perlindungan terhadap peroksidasi lipid spontan dengan meningkatkan aktivitas peroksidase glutathion. Aktivitas peroksidase glutathion dapat mengubah radikal OH^\cdot (Hidroksil) menjadi H_2O (molekul air). Vitamin B12 dalam pengencer sperma bekerja dengan menurunkan jumlah ROS berlebih yang dihasilkan dari proses oksidasi metabolisme spermatozoa selama proses pembekuan terjadi (Manzanares and Gil, 2010).

Molekul nonpolar seperti oksigen merupakan hidrofobik atau zat yang tidak dapat larut dalam air tetapi larut dalam lemak sehingga oksigen dapat dengan mudah melewati membran. Kelebihan jumlah oksigen dalam membran spermatozoa menyebabkan terbentuknya rantai radikal bebas. Vitamin C yang ditambahkan dalam pengencer bekerja dengan memasuki struktur lipid membran dengan memutus rantai radikal yang terjadi dan mengakhiri reaksi berantai peroksidasi lipid. Peroksidase glutathion merupakan enzim intraseluler yang aktivitasnya ditemukan di mitokondria sel. Vitamin B12 merupakan koenzim dalam reaksi peroksidase glutathion. Reaksi ini

menghasilkan molekul air (H_2O) dengan mengubah radikal OH^\cdot atau hidroksil. Peningkatan aktivitas reaksi enzim ini dapat melindungi membran mitokondria dari kerusakan akibat radikal bebas, membran mitokondria yang terlindungi akan menghasilkan ATP sebagai energi dari spermatozoa untuk bertahan hidup dan bergerak. Kombinasi kedua vitamin ini memberikan perlindungan yang optimal terhadap kerusakan membran plasma spermatozoa akibat terjadinya peroksidasi lipid.

Kerusakan membran plasma juga dipengaruhi oleh metode thawing yang digunakan. Penelitian ini menggunakan metode thawing semen beku domba dengan suhu $\pm 37^\circ\text{C}$ selama 15 detik. Semakin cepat perubahan suhu thawing dapat mengurangi tekanan spermatozoa melewati masa tidak stabil (kritis) dengan cepat, sehingga spermatozoa hidup dan normal lebih banyak (Sari, 2008). Thawing dengan suhu 37°C dapat membantu semen untuk melewati masa kritisnya dengan cepat karena suhu tersebut sama dengan temperatur tubuh ternak (Utomo dan Boquifai, 2010). Proses metabolisme yang meningkat pada suhu 37°C tidak akan mengurangi substrat energi spermatozoa sehingga motilitas spermatozoa akan tinggi karena tidak kekurangan energi (Zenichiro *et al.*, 2002). Lama pencelupan pada air thawing yang pendek memberikan sedikit kerusakan sehingga spermatozoa hidup lebih maksimal dan tetap memiliki kemampuan membuahi ovum yang tinggi (Sari, 2008).

Tabel 3. *Post Thawing Motility Spermatozoa Domba Sapudi*

Perlakuan	Ulangan (n)	<i>Post Thawing Motility</i> (PTM) Spermatozoa (%) (rerata \pm standar deviasi)	Kecepatan Gerak Spermatozoa
P0	6	41,67 ^a \pm 5,164	3
P1	6	40,83 ^a \pm 2,041	3
P2	6	55,00 ^b \pm 4,472	3

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Tabel 4. *Viabilitas Spermatozoa Domba Sapudi Post Thawing*

Perlakuan	Ulangan (n)	Viabilitas Spermatozoa (%) (rerata \pm standar deviasi)
P0	6	56,50 ^a \pm 4,930
P1	6	54,17 ^a \pm 2,927
P2	6	69,33 ^b \pm 3,077

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$)

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa penggantian dan penambahan vitamin B12 sebanyak 5 µg/ml dalam pengencer susu skim kuning telur mampu mempertahankan persentase motilitas dan viabilitas spermatozoa domba Sapudi *post thawing*.

Daftar Pustaka

- Asadpour, R., M.M. Pourseif., G. Moghadam., R.Jafari., H. Tayei and H. Mahmodi. 2012. Effect of Vitamin B12 addition to Extenders on Some Physicochemical Parameters of Semen in Crossbred Rams. *African Journal of Biotechnology*. 11(54): 11741-11745.
- Banihani, S. A. 2017. Vitamin B12 and Semen Quality. *Jordan University of Science and Technology*. Jordan. 4-5.
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2016. Pedoman Teknis Penyediaan Semen Beku, Tenaga Teknis dan Sarana IB serta Pelaksanaan IB. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan. Jakarta.
- Dinas Peternakan Daerah Propinsi Jawa Timur. 2017. Data Statistik Populasi Ternak Propinsi Jawa Timur. <http://www.disnak.jatimprov.go.id/web/data/datastatistik/statistikpopulasiternak>. [28 November 2017].
- Gazali, Muhamad dan S.N. Tambing. 2002. Kriopreservasi Sel Spermatozoa. *Hayati*. 9(1) : 27-32.
- Hardijanto., S. Susilowati., T. Hernawati., T. Sardjito., dan T.W. Suprayogi. 2010. Inseminasi Buatan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Airlangga University Press. Surabaya. 75-91.
- Herdis., I. Kusuma., M. Surachman., M. Rizal., I. K. Utama., I.Indunu., B. Purwantara dan I. Arifiantini. 2002. Peningkatan Kualitas Semen Beku Domba Garut melalui Penambahan α -Tokoferol ke dalam Pengencer Susu-Skim Kuning Telur. *JITV*. 7(1):12-17.
- Inounu, I. 2014. Upaya Meningkatkan Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Ternak Ruminansia Kecil. *Wartazoa*. Bogor. 24(4):201-209.
- Kusriningrum. 2008. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. 44.
- Manzanares, William dan Gil Hardy. 2010. Vitamin B12 : The Forgotten Micronutrient for Critical Care. Wolters Kluwer Health. 13: 662 – 668.
- Muino-Blanco, T., R. Perez-Pe dan J.A. Cebrian-Perez. 2008. Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reprod Dom Anim*. 43(4):18-31.
- Nimse, S.B dan Dilipkumar Pal. 2015. Free Radicals, Natural Antioxidants, and Their Reaction Mechanisms. *The Royal Society of Chemistry*. 5:27986-28006
- Pamungkas, F.A. 2009. Potensi dan Kualitas Semen Kambing dalam Rangka Aplikasi Teknologi Inseminasi Buatan. *Wartazoa*. 19(1):17-22
- Rizal, M. dan Herdis. 2010. Peranan Antioksidan Dalam Meningkatkan Kualitas Semen Beku. *Makalah Ilmiah*. Jakarta. 112-118
- Sari, S.N. 2008. Pengaruh Suhu dan Lama Thawing terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi Fries Holland. [Skripsi]. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Setyaningsih, N.I. 2012. Pengaruh Penambahan Vitamin C dalam Pengencer Tris Kuning Telur Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Merino Post Thawing. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Susilowati, S., Hardijanto., T.W. Suprayogi., T. Sardjito dan T. Hernawati. 2010. Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (IB). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 11-22, 35-36.
- Tiesnamurti, B., dan A. A. Santiananda. 2006. Pengelolaan dan Pemanfaatan Sumber Daya Genetik Domba Sapudi. Prosiding Lokakarya Nasional Pengelolaan dan Perlindungan Sumber Daya Genetik di Indonesia.
- Utomo, S dan E. Boquifai. 2010. Pengaruh Temperatur dan Lama Thawing terhadap Kualitas Spermatozoa Sapi dalam Penyimpanan Straw Beku. *Sains Peternakan*. Yogyakarta. 8(1):22-25.
- Zenichiro dkk., 2002. Intruksi Praktis Teknologi Prosesing Semen Beku pada Sapi. Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari-JICA. Malang.