

Fertilitas Spermatozoa Ayam Buras dengan Penambahan Antioksidan Glutathione dalam Pengencer Ringer's Selama Simpan Dingin

Iswati¹, Nurul Isnaini², Trinil Susilawati²

¹) STPP Malang dan Mahasiswa Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang

²) Bagian Produksi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang

Corresponden author : ibuke.lintang@gmail.com dan trinil_susilawati@yahoo.com

ABSTRACT : Testing of spermatozoa fertility in vivo is needed to find out the extent of the ability of spermatozoa fertilization in the female reproductive tract. The fertility ability of spermatozoa in fertilizing the ovum is indicated by the number of fertile eggs from the number of eggs incubated resulting from the mating with Artificial Insemination (AI). The aim of this research is to know the percentage of fertility of eggs from AI using semen which has been stored cold for 8 hours on Ringer's diluent with the addition of antioxidant glutathione. Collection semen with teaser female method is done in Poultry Breeder Installation of Sekolah Tinggi Penyuluhan Pertanian (STPP) Malang. The 30 female chickens were divided into 3 groups of treatment P0: AI using fresh semen with Ringer's diluent, P1: AI using cold semen with Ringer's Diluent (8 hours duration storage) and P2: AI using cold semen with 0.5 mM addition in Diluent Ringer's (8 hours duration storage). Experiment design using Complete Randomized Design (CRD) and nonparametric data analysis with chi-square. The observed variable was egg fertility calculated based on egg fertility percentage. The results showed that the dilution treatment had a significant effect ($P < 0,05$) on fertility egg, with the best result indicated by P0 that is 76% fertility, followed by P2 with fertility 42% and P1 which showed the lowest fertility was 34%. AI with cold semen has not demonstrated a good percentage of fertility despite 0.05 mM glutathione added as an antioxidant. It is recommended that AI in domestic poultry using fresh semen with Ringer's diluent, is done as soon as possible to obtain optimum fertility.

Keywords: fertility, domestic chicken, Artificial Insemination, glutathione, teaser female

PENDAHULUAN

Keberhasilan IB pada ayam tergantung pada beberapa faktor, antara lain: strain ayam, umur ayam, bahan pengencer dalam penyimpanan semen, derajat pengenceran atau dosis inseminasi, kualitas semen, deposisi semen, dan waktu inseminasi (Ridwan, 2008; Danang dkk., 2012,). Wiyanti dkk (2013), juga menyatakan bahwa faktor keberhasilan IB dipengaruhi oleh penyimpanan,

pengenceran semen, kesuburan betina, dan keterampilan inseminator. Hal ini diperjelas oleh Alkan, *et al.*, (2002) bahwa keberhasilan IB sangat ditentukan oleh kualitas semen yang dikoleksi. Hal senada dilaporkan oleh Modupe *et al.*, (2013) bahwa kualitas semen berpengaruh penting terhadap fertilitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa 50×10^6 dilaporkan cukup untuk mencapai fertilitas yang baik pada ayam dan kalkun. Donoghue and

Wishart (2000) menjelaskan pula bahwa beberapa faktor yang mempengaruhi fertilitas dalam program IB adalah kualitas semen yang dipengaruhi oleh hal-hal sebagai berikut : pejantan, pencahayaan, musim, berat badan, diet pakan dan koleksi semen.

Pada unggas, uji kualitas sperma mempunyai hubungan yang signifikan terhadap kemampuan fertilisasi. Prinsip umum uji kualitas sperma menggambarkan beberapa fungsi sperma yang ditunjukkan selama interaksinya di dalam saluran reproduksi betina dan ovum. Pada eksperimen yang lain uji fertilitas dikatakan memiliki hubungan yang rendah dengan uji kualitas spermatozoa. Hal yang menyebabkan rendahnya hubungan antara uji kualitas sperma dan kemampuan fertilisasi karena interaksi tersebut melibatkan banyak faktor sedangkan pengujian hanya memperhatikan sedikit variabel (Wishart, 2009). Meskipun demikian fertilitas adalah suatu hal yang pertama dan paling penting dalam usaha pengembangan *breeding* pada unggas. Jumlah telur yang fertil yang dihasilkan pada penetasan menentukan profitabilitas dari seekor ayam. Meskipun pejantan dan betina keduanya memberikan pengaruh pada penurunan fertilitas, namun angka fertilitas yang rendah dianggap sebagai masalah besar pada pejantan (Khan, 2011).

Habibullah (2015) menjelaskan bahwa IB pada unggas adalah proses koleksi semen dari unggas jantan kemudian memasukkan semen ke dalam saluran reproduksi betina untuk mendapatkan telur yang fertil. Proses IB pada unggas seperti yang dikemukakan oleh Getachew (2016), semen dari unggas jantan dikoleksi kemudian dimasukkan ke *oviduct* unggas betina untuk mendapatkan fertilitas telur. Dosis semen yang dideposisikan di

oviduct hendaknya memperhatikan kesehatan dan kesejahteraan unggas sehingga mencapai tingkat kesuburan yang tinggi. Volume semen yang dibutuhkan umumnya 0,1 ml, dengan konsentrasi minimal 100 - 200 juta spermatozoa per inseminasi, yang dimasukkan ke dalam vagina unggas betina. Hal senada diperjelas oleh Hopkins dan Evans (2003) dosis semen yang direkomendasikan untuk ayam adalah 0,1 ml dengan konsentrasi 300 juta spermatozoa. Syringe inseminasi dimasukkan ke dalam vagina ayam dengan kedalaman sekitar 3 cm dan semen dideposisikan pada posisi tersebut. Waktu yang direkomendasikan untuk IB adalah sore hari untuk menghindari adanya telur dalam uterus.

Kualitas spermatozoa secara *in vitro* dapat digunakan sebagai dasar dalam memperkirakan kemampuan fertilisasi spermatozoa, namun keberhasilan dalam membuahi ovum penting untuk diuji secara *in vivo*. Ukuran keberhasilan IB pada ayam adalah persentase fertilitas telur. Fertilitas ini menandakan terjadinya pembuahan antara spermatozoa dan ovum dalam saluran reproduksi betina ayam. Fertilitas telur merupakan jumlah telur yang fertil dari sejumlah telur yang diinkubasi hasil inseminasi buatan (Saleh dan Isyanto, 2011).

Inseminasi Buatan dengan menggunakan semen segar telah banyak dilakukan, penelitian Irastuti (2011) menyebutkan bahwa fertilitas telur ayam buras dengan interval IB 3 hari sekali sebesar 70,83 (%). Perkembangan metode penyimpanan semen ayam dalam bentuk simpan dingin maupun simpan beku menuntut adanya evaluasi kualitas spermatozoa melalui uji fertilitas. Penelitian Saleh dan Isyanto (2011) menyatakan bahwa persentase fertilitas telur menurun seiring lama simpan semen pada suhu 10°C, pada

lama simpan 3 jam persentase fertilitas telur sebesar 56,18%.

Penambahan bahan pengencer yang dapat meningkatkan kemampuan fertilisasi telah dilakukan oleh Thananurak *et al.*, (2015) yaitu dengan penambahan antioksidan glutathione yang mampu menghambat kerusakan membran akibat peroksidasi lipid selama pembekuan semen ayam, namun angka fertilitas masih rendah yaitu 62,08% pada penambahan 0,5 mM glutathione pada media thawing semen beku ayam selama 1 jam pada suhu 5°C. Penyimpanan yang lebih lama pada suhu 3-5°C dengan penambahan antioksidan glutathione dalam pengencer semen ayam diharapkan mampu mempertahankan kualitas spermatozoa sehingga mampu meningkatkan kemampuan fertilisasi, namun sejauh ini masih sebatas evaluasi *invitro*. Pengujian kualitas spermatozoa secara *invitro* pada penelitian Danang dkk., (2012) memperlihatkan bahwa pada pengencer Ringer's spermatozoa ayam dapat bertahan selama penyimpanan dingin selama 18 jam, namun belum dilakukan uji fertilitas spermatozoa secara *in vivo*. Penelitian sebelumnya tentang penambahan glutathione pada pengencer Ringer's selama simpan dingin menghasilkan kualitas spermatozoa mampu bertahan pada konsentrasi 0,5 mM selama 8 jam dengan motilitas individu, viabilitas dan abnormalitas berturut-turut sebesar 62±9,19%, 79,26±8,49% dan 13,66±0,31%. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan pengujian fertilitas spermatozoa ayam buras dengan pengencer Ringer's yang ditambahkan 0,5mM glutathione setelah penyimpanan suhu 3-5°C selama 8 jam untuk mengetahui persentase fertilitas telur ayam buras.

MATERI DAN METODE

Materi penelitian

Penelitian ini menggunakan ayam jantan sebanyak 2 ekor dengan umur 1 tahun dan 13 bulan, memiliki bobot badan 2,5 kg. Ayam buras betina sebanyak 30 ekor, dengan umur 40 minggu dan berat badan 1,7–2,2 kg. Ayam akseptor IB dibagi ke dalam 3 kelompok perlakuan sehingga masing-masing perlakuan sejumlah 10 ekor dengan perlakuan sebagai berikut: semen segar dengan pengencer Ringers (P0), semen dingin dengan pengencer Ringer dengan lama simpan 8 jam pada suhu 3-5°C (P1), dan semen dingin dengan penambahan glutathione 0,5mM dalam pengencer Ringer's yang telah disimpan pada suhu 3-5°C selama 8 jam (P2).

Peralatan yang digunakan untuk penampungan semen metode betina pemancing antara lain: spuit 1ml, tabung plastik untuk menampung semen kapasitas 10 cc, tabung plastik dengan tali karet sebagai *artificial cloaca*, aluminium foil, spidol permanen, kertas label. Alat untuk pembuatan pengencer antara lain: erlenmeyer, *magnetic stirrer*, kertas saring, timbangan analitik, tabung ukur, aluminium foil. Bahan pengencer yang digunakan antara lain: bahan pengencer berupa larutan Ringer's laktat yang mempunyai komposisi per 1000 ml yaitu: Sodium klorida 6,0 g, Sodium Laktat 3,1 g, Potassium Klorida 0,3 g dan Kalsium Klorida 2H₂O 0,2 g (Danang dkk., 2012) dan bahan antioksidan *Glutathione* (Jincheng Pharm; CAS 70-18-8).

Peralatan IB ayam antara lain : tabung tempat semen, spuit 1cc (spuit *tuberculine*) dengan bagian ujung dipasang selang karet steril dengan panjang ± 2-3 cm. Peralatan penetasan adalah 1 unit mesin tetas otomatis dan 1 unit lampu peneropong (*candling*).

Metode penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental yaitu perlakuan IB menggunakan tiga pengencer terhadap masing-masing 10 ekor ayam buras betina.

Penampungan Semen

Penampungan semen dengan menggunakan metode betina pemancing (*teaser female*). Metode penampungan tersebut mengadopsi dari penelitian Chelmonska (2008) yang melakukan penampungan semen pada burung puyuh tanpa pijat urat pada daerah abdomen hingga kloaka namun menggunakan rangsangan ayam betina. Penampungan semen dilakukan dengan cara sebagai berikut : terlebih dahulu bulu disekitar kloaka dicukur, bagian sekitar bibir dan kloaka tersebut dibersihkan dari kotoran yang menempel dengan tisu yang dibasahi dengan alkohol 70%. Selanjutnya dipasang tabung sebagai *artificial cloaca* (Malecki and Martin, 2002) yang diikatkan pada punggung ayam, kemudian pejantan didekatkan pada betina pemancing dan pejantan akan muncul respon untuk menaiki betina, dalam beberapa detik ejakulasi akan terjadi dan semen tertampung dalam tabung *artificial cloaca*. Tali pengikat tabung dilepaskan dan semen yang tertampung di sedot dengan spuit 1 ml untuk mengetahui volume semen, selanjutnya dituang dalam tabung yang berisi bahan pengencer.

Inseminasi Buatan (IB)

Ayam betina diinseminasi dengan semen yang telah diencerkan sesuai dengan perlakuan. Inseminasi Buatan dilakukan 2 kali seminggu, dosis semen 0,2 ml per ekor dengan konsentrasi spermatozoa 200 juta/ dosis IB. Ayam betina diinseminasi dengan metode intravaginal yaitu 2-4 cm dalam

vagina. Inseminasi Buatan dilakukan pada sore hari jam 16.00 WIB, untuk menghindari adanya telur dalam uterus (Dononghue dan Wishart, 2000; Gethachew, 2016).

Pengumpulan telur hasil inseminasi

Koleksi telur dilakukan hari ke-2 sampai hari ke-6 setelah IB. Telur yang telah dikoleksi kemudian dibersihkan dari kotoran, telur diberi kode sesuai dengan tanggal bertelur, nomor ayam dan kelompok perlakuan. Telur yang telah ditandai dimasukkan ke dalam mesin tetas yang telah difumigasi sebelumnya, dengan suhu 38°C (100°F). Pada hari ke tujuh inkubasi, telur diperiksa fertilitasnya dengan metode *candling* (peneropongan telur) untuk menentukan fertilitas telur (Tabatabaei, 2010).

Parameter yang diamati

Parameter yang diamati adalah persentase fertilitas telur. Telur yang dianggap fertil ditandai dengan adanya tunas dengan cabang-cabang urat darah dan telur infertil yang ditandai dengan titik atau lingkaran berwarna kehitaman. Persentase fertilitas menurut Modupe *et al.*, (2013) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Fertilitas telur (\%)} = \frac{\text{Jumlah telur yang fertil}}{\text{Jumlah telur yang ditetaskan}} \times 100\%$$

Rancangan Percobaan dan analisis statistik

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 Perlakuan dan 10 ulangan. Perlakuan yang dicobakan adalah sebagai berikut :

P0 = semen segar dengan pengencer Ringer's

P1 = semen dingin dengan pengencer Ringer's (8 jam)

P2 = semen dingin dengan pengencer Ringer's + 0,5 mM glutathione (8 jam)

Data yang diperoleh di analisis dengan uji chi square untuk melihat apakah nilai pengamatan sesuai dengan nilai harapan dari fertilitas telur pada 3 perlakuan tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fertilitas telur dihitung dari total telur yang fertil di bagi dengan total telur yang diinkubasi dikalikan 100% (Modupe *et al.*, 2013). Hasil rata-rata fertilitas spermatozoa ayam buras dari ketiga perlakuan tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Rataan Fertilitas Spermatozoa Ayam Buras pada Tiap Perlakuan

Perlakuan	Rataan Fertilitas (%)
P0	76,0
P1	34,0
P2	42,0

Berdasarkan Tabel 5, persentase fertilitas tertinggi ditunjukkan oleh semen segar dengan pengencer Ringer's (P0) yaitu 76%. Persentase fertilitas dari semen dingin pada pengencer Ringer's setelah penyimpanan 8 jam pada suhu 3-5°C menunjukkan penurunan fertilitas yaitu 34 % (P1) dan penambahan glutathione dalam penyimpanan 8 jam pada suhu 3-5°C menunjukkan fertilitas sebesar 42 % (P2). Hal ini sesuai hasil penelitian Solihati *et al.*, (2006) bahwa fertilitas menurun pada IB dengan semen yang telah disimpan pada suhu 4-5°C pada lama simpan 1 jam (43,24%), 24 jam (21,68%) dan 48 jam (10,32%). Hasil penelitian yang dilaporkan Saleh dan Isyanto (2011) menunjukkan bahwa pada penyimpanan 10°C menghasilkan fertilitas yang semakin menurun yaitu pada lama simpan 0 jam, 1 jam, 2 jam dan 3 jam dengan hasil fertilitas

berturut-turut sebesar 80,80%, 60,50%, 57,68%, dan 56,18%. Perbedaan hasil dari penelitian karena beberapa faktor antara lain strain ayam, umur, deposisi semen, konsentrasi semen, jumlah spermatozoa yang diinseminasikan, jenis pengencer dan lama koleksi telur (Modupe *et al.*, 2013).

Inseminasi Buatan menggunakan semen segar dengan pengencer Ringer's pada penelitian ini menghasilkan fertilitas 76%, lebih tinggi daripada penelitian Ridwan dan Rusdin (2008) yang melakukan IB menggunakan semen segar dengan pengencer Ringer's menghasilkan fertilitas 74,73%. Hasil penelitian ini juga menunjukkan fertilitas telur yang lebih tinggi dari penelitian Tabatabaei (2010) yang melakukan IB menggunakan semen segar dengan pengencer Ringer's pada dosis 100 juta per inseminasi yang menghasilkan persentase fertilitas optimum yaitu 72,37±5,28% sedangkan IB dengan dosis 200 juta per inseminasi menghasilkan fertilitas 89,12±3,74%. Hal ini karena pengencer Ringer's mengandung Na-laktat diperlukan untuk mempertahankan keasaman larutan dan tekanan osmotik larutan (Danang, dkk., 2012). Pelaksanaan IB dilakukan paling lama 30 menit setelah koleksi semen sehingga belum terjadi metabolisme dan stress oksidatif yang berlebihan dibandingkan semen yang dilakukan penyimpanan dingin. Hal ini diperjelas oleh Getachew (2016) bahwa semen unggas akan kehilangan viabilitas setelah lebih dari 1 jam penampungan, sehingga inseminasi harus dilakukan sesegera mungkin setelah koleksi semen.

Hasil analisis antara pengenceran dengan persentase fertilitas dilakukan dengan uji non parametrik chi square. Berdasarkan nilai chi square

yang lebih besar dari pada nilai tabel chi square, menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara frekuensi yang teramati dengan frekuensi harapan pada perlakuan pengenceran terhadap persentase fertilitas telur. Persentase fertilitas yang diharapkan dari IB pada ayam adalah 89% (Tabatabaei, 2010). Pada penelitian ini, IB yang dilakukan menggunakan konsentrasi spermatozoa yang sama, tempat deposisi semen, inseminator dan waktu IB yang sama namun pengencer dan penyimpanan semen yang berbeda menghasilkan angka fertilitas yang berbeda. Hal ini sesuai pendapat Donoghue and Wishart (2000) bahwa variasi hasil analisis fertilitas disebabkan oleh pengencer yang berbeda, waktu inseminasi, kedalaman deposisi semen pada vagina, dosis spermatozoa dan frekuensi IB. Penyimpanan semen bisa berkisar anatar 6-48 jam, namun fertilitas nya menurun setelah penyimpanan 6 jam, bahkan penyimpanan lebih dari 24 jam akan semakin menurunkan angka fertilitas, karena diperkirakan lebih dari 30% spermatozoa yang hidup setelah penyimpanan 24 jam tidak mampu bertahan mencapai oviduct (Donoghue and Wishart, 2000).

Persentase Fertilitas telur pada IB dengan semen yang telah disimpan selama 8 jam pada suhu 3-5°C pada pengencer Ringe's hanya sebesar 34% hal ini diperkirakan karena selama simpan dingin spermatozoa mengalami stress oksidatif dan cold shock. Semen ayam mengandung berbagai macam asam lemak tak jenuh yang teroksidasi selama penyimpanan menghasilkan Reactive Oxygen Species (ROS). Oksigen spesies sangat aktif dalam level seluler menghasilkan berbagai derajat kerusakan sel spermatozoa. Sel spermatozoa rentan terhadap lipid peroksidase oleh radikal bebas seperti

Hidrogen peroksida, Superoksid anion, dan hydroxyl radical yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan struktur membran spermatozoa selama penyimpanan aerobik (Donoghue and Wishart, 2000; Zeitoun and Aldamegh, 2015). Cold shock selama penyimpanan semen memicu terjadinya stress pada membran sel spermatozoa melalui radikal bebas sehingga menyebabkan kerusakan spermatozoa (Sanocka and Kupisz, 2004; Thuwanut *et al.*, 2011). Kerusakan pada membran spermatozoa berdampak pada rendahnya kemampuan fertilisasi dari spermatozoa yang secara *invivo* ditunjukkan dengan rendahnya angka fertilitas telur.

Upaya dalam melindungi spermatozoa selama penyimpanan dari kerusakan fisik maupun kimia antarlain adalah penambahan antioksidan enzymatic secara exogen atau penambahan dalam pengencer semen. Salah satu antioksidan itu adalah glutathione. Antioksidan memiliki mekanisme pertahanan dalam melawan lipid peroksidase dari semen dan memelihara motilitas dan viabilitas spermatozoa (Maia *et al.*, 2009). Penambahan antioksidan glutathione dalam pengencer semen diharapkan menurunkan tingkat kerusakan membran spermatozoa sehingga kemampuan fertilisasi spermatozoa dapat dipertahankan.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa persentase fertilitas telur dari pengencer semen ayam yang telah ditambah dengan antioksidan glutathione 0,5Mm sebesar 42%, hasil ini belum mampu menunjukkan fertilitas yang tinggi seperti IB dengan semen segar tanpa penyimpanan. Penambahan antioksidan glutathione diharapkan dapat menangkal reaksi peroksidase lipid sehingga mampu bertahan selama penyimpanan dingin. Berdasarkan

hasil evaluasi spermatozoa selama penyimpanan dingin 8 jam, secara visual masih menunjukkan kualitas spermatozoa yang layak untuk IB yang dilihat dari parameter motilitas individu 62%, viabilitas 79,26% dan abnormalitas spermatiozoa 13,66%. Akan tetapi uji *in vivomelalui* aplikasi IB belum mampu menunjukkan fertilitas yang lebih baik dibandingkan IB dengan semen segar. Hal senada dilaporkan pula oleh Thananurak (2015) bahwa penambahan glutathione 0,5mM pada post thawing semen beku ayam selama 1 jam, persentase fertilitasnya mencapai 62,08 ±1,23% dan lebih rendah dibandingkan IB tanpa penambahan glutathione dalam pengencer semen. Menurut Donoghue and Wishart (2000), kemampuan fertilisasi dari semen beku unggas setelah di thawing dipengaruhi oleh dosis spermatozoa, frekuensi inseminasi dan deposisi semen dalam saluran reproduksi betina. Deposisi semen dilakukan pada bagian intravaginal, spermatozoa akan menuju daerah uterovagina sebagai Sperm Storage Tubules (SSTs) yang selanjutnya akan melakukan pergerakan menuju infundibulum untuk melakukan fertilisasi. Akan tetapi hanya spermatozoa yang potensial dan terseleksi yang dapat mencapai tempat fertilisasi (Ridwan dan Rusdin, 2008). Spermatozoa dapat kehilangan fertilitas walaupun secara visual masih hidup karena untuk mencapai tempat fertilisasi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain adalah transport melewati vagina masuk ke dalam Sperm Storage Tubules (SSTs) yang memerlukan motilitas spermatozoa. Akan tetapi Motilitas yang tepat tidak cukup untuk memastikan pembuahan, karena sperma harus melewati proses fisiologis kapasitas dalam saluran reproduksi betina. Transport dari SSTs menuju

infundibulum juga memerlukan kontraksi uterus. Setelah sampai pada tempat fertilisasi membutuhkan pengikatan antara bagian inner periviteline (Wishart., 2009).

KESIMPULAN

Pengenceran dan penyimpanan semen ayam pada suhu 3-5°C menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap fertilitas spermatozoa ayam buras. Inseminasi Buatan dengan menggunakan semen segar menunjukkan hasil yang terbaik pada persentase fertilitas telur, sedangkan IB dengan semen yang telah disimpan selama 8 jam pada suhu 3-5°C belum memberikan hasil yang lebih baik meskipun telah ditambahkan antioksidan glutathione dalam pengencer dasar Ringer's. Penggunaan semen segar ayam yang telah diberi pengencer Ringe's untuk aplikasi IB sebaiknya dilakukan sesegera mungkin untuk memperoleh fertilitas yang optimum.

DAFTAR PUSTAKA

- Alkan, S., A. Baran, O.B. Ozdas dan, M. Evecen 2002. Morphological defects in turkey semen. *Turk.J. Vet. Animal Science*. 26:1087-1092.
- Chelmonska, B., A. Jerysz, E. L. Ukaszewicz, A. Kowalczyk, I. Malecki. 2008. Semen Collection from Japanese Quail (*Coturnix japonica*) Using a Teaser Female. *Turk.J. Vet. Anim. Sci.* 32(1): 19-24
- Danang, D.R, N. Isnaini dan P. Trisunuwati. 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
- Donoghue. A.M., and G.J. Wishart (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproductive Science*, 62: 213-232.
- Getachew, T. 2016. A Review Article of Artificial Insemination in Poultry. *World's Veterinary Journal*. 6 (1):26-35.
- Habibullah, M., M. A. Hashem, M. S. Rana and M. H. Islam. 2015. Effect of Artificial Insemination on different production parameter in Hubbard classic broiler parent stock. *J. Bangladesh Agril. Univ*. 13(1): 71–77.
- Hopkins, S.M. and L.E. Evans. 2003. *Artificial Inseminations in McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Edited by Mauricho H. Pineda and Michael P. Dooley. 5th edition. Iowa state Press. USA: 366-368.
- Irastuti. 2011. Pengaruh Bangsa Pejantan dan Interval Deposisi Sementerdahap Keberhasilan Inseminasi Buatan pada ayam. *Jurnal Sains dan Teknologi Tadulako*. 1(1): 13-25.
- Khan, R.U. 2011. Antioxidant and Poultry Semen Quality. *World's Poultry Science Journal*. 67: 298-308.
- Maia, M.S., S.D. Bicudo, H.C. Azevedo, C.C. Sicherle, D.B. Sousa, and L. Rodello. 2009. Motility and Viability of Ram Sperm Cryopreserved in a Tris-Egg Yolk Extender Supplemented with Anti-Oxidants. *Small Ruminant Research*. 85: 85-90.
- Malecki, I., and G.B. Martin. 2002. Semen collection in the emu and ostrich. *Proceedings of the World Ostrich Congress. Warsaw, Poland*: 38-43.
- Modupe, O., A. C. Livinus and N.B. Ifeanyi. 2013. Semen Quality Characteristic and Effect of Mating Ratio on Reproductive Performance of Hubbarrd Broiler Bredders. *Journal of Agriculture Science*. 5(1) 154-159.
- Ridwan dan Rusdin. 2008. Konservasi Semen Ayam Buras Menggunakan Berbagai Pengencer Terhadap Fertilitas Dan Periode Fertil Spermatozoa Pasca Inseminasi Buatan. *J. Agroland* 15 (1) : 63 – 67.
- Saleh D.M., dan A.Y. Isyanto . 2011. Pengaruh Lama Penyimpanan terhadap Motilitas dan Fertilitas Spermatozoa Ayam Kate Lokal. *Ckrawala Galuh*. 1(6): 1-6.
- Sanocka, D.M. and Kurpisz, M. 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2: 12-18.
- Solihati, N., A. Pinnezak R. Idi, R. Setiawan, I.Y. Asmara, B.I. Sujana., 2006. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Cair Ayam Buras pada Suhu 5°C terhadap Periode Fertil dan Fertilitas Sperma. *Jurnal Ilmu ternak*. 6(1):7-11
- Surai, P.F., N. Fujihara, B.K. Speake, J-P. Brillard, G.J. Wishart and N.H.C. Sparks. 2001.

- Polyunsaturated Fatty Acids, Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection in Avian semen. Review. *Asian-Aust.J.Animal science*. 14 (7): 1024-1050.
- Tabatabaei, S. 2010. The effect Spermatozoa Number on Fertility Rate of Chicken in Artificial Insemination Programs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9(12): 1717-1719.
- Thananurak, P.,C. Sittikasamkit, T. Vongpralub and K. Sakwiwatkul. 2015. Effects of Addition of Reduced Glutathione to Thawing media on Motility Parameters, Lipid Peroxidation and Fertility Rate in Frozen-Thawed Chicken Spermatozoa. *Khon Kaen Agr Journal*. 43 (suplement 2): 98-102.
- Thuwanut, P., K. Chatdarong, A.S Bergqvist, L. Söderquist, K. Thiangtum, D Tongthainan, and E. Axner. 2011. The Effects of Antioxidants on Semen Traits and in Vitro Fertilizing Ability of Sperm from Flat-Headed Cat (*Prionailurus planiceps*). *Theriogenology*. 76: 115-125.
- Zahariev Z., R. Stefanof., M. Sabev., K. Miteva., and I. Nikolav.,2007. *Cytochrome Affect Viability and Fertility of Bull Semen*, *am-Euras. J. Agric and Environ*.2(1): 48-50