

## MOTILITAS SPERMATOZOA AYAM KAMPUNG MENGGUNAKAN PENGENCER YANG DITAMBAHKAN MADU MONOFLORA DENGAN LEVEL DAN JENIS YANG BERBEDA

**Sudarmi**

*Program Studi Peternakan, Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Muhammadiyah Sinjai  
(email: [sudarmiamir08@gmail.com](mailto:sudarmiamir08@gmail.com))*

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai level dan jenis madu monoflora terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dan mengetahui level dan jenis madu terbaik untuk mempertahankan kualitas spermatozoa ayam kampung. Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial dimana faktor pertama yaitu level madu dalam pengencer (0%, 2%, 4% dan 6%) sedangkan faktor kedua yaitu jenis madu monoflora (madu randu, madu kaliandra serta madu kopi), motilitas spermatozoa diamati selama penyimpanan jam ke-0, 24, 48, 96 dan 120. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan level madu yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung dan level madu terbaik yaitu 2% sampai penyimpanan 48 jam. Penambahan berbagai jenis madu monoflora berpengaruh nyata terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dan jenis madu terbaik yaitu madu randu dan madu kaliandra serta terdapat interaksi antara level madu dan jenis madu yang digunakan.

Kata kunci: madu, pengencer, spermatozoa, ayam kampung

### PENDAHULUAN

Ayam kampung merupakan ternak asli Indonesia dan tersebar hampir di seluruh pelosok tanah air. Ayam Kampung mempunyai peran yang sangat besar bagi kehidupan masyarakat terutama di pedesaan dijadikan sebagai sumber daging, telur dan sebagai tambahan pendapatan. Pada umumnya pemeliharaan ayam kampung tergolong mudah, tidak membutuhkan modal besar, dan cepat beradaptasi dengan lingkungan, selain sifat-sifat tersebut ayam kampung juga mempunyai beberapa kelemahan seperti pertumbuhan yang lambat, produksi rendah, masih mempunyai sifat mengeram, lambat dewasa kelamin, selang waktu bertelur yang lama akibat mengasuh anak, rendahnya mutu genetik dan harganya relatif lebih mahal dari hasil ternak unggas lainnya karena permintaan yang tinggi tidak diimbangi oleh peningkatan produksi (Suharyanto, 2007).

Salah-satu cara untuk meningkatkan mutu genetik dapat dilakukan dengan cara Inseminasi Buatan (IB). Inseminasi merupakan suatu teknik peternakan modern yang diterapkan secara efisien pada peternakan yang sudah maju dan keberhasilan IB

dipengaruhi oleh kualitas semen dan bahan pengencer yang digunakan untuk penyimpanannya. Kualitas spermatozoa untuk IB sangat ditentukan oleh jenis bahan pengencernya. Daya fertilisasi optimum spermatozoa harus dipreservasi atau diawetkan untuk beberapa lama setelah penampungan untuk mempertahankan kualitas agar penggunaan pejantan yang bebas penyakit dan bermutu genetik tinggi secara maksimal dapat tercapai dalam program IB. Oleh karena itu, spermatozoa perlu dicampur dengan larutan pengencer yang menjamin kebutuhan fisik dan kimiawinya serta disimpan pada suhu dan kondisi tertentu yang mempertahankan kehidupan spermatozoa selama waktu yang diinginkan untuk kemudian dipakai sesuai kebutuhan.

Berbagai usaha dilakukan untuk memperoleh bahan pengencer yang cocok untuk semen ayam yang relatif murah, mudah didapat, dan efektif untuk pengenceran dan penyimpanan sehingga dapat tahan lama hidup dengan kualitas yang tetap baik. Tetapi untuk mengoptimalkan jangka waktu bertahan hidup spermatozoa, perlu ditambahkan bahan pengencer yang dapat memberikan energi bagi spermatozoa. Salah satu sumber energi yang penting bagi kehidupan spermatozoa adalah gula (Dwitarizki *dkk.*, 2015).

Gula sederhana (monosakarida) dibutuhkan oleh spermatozoa untuk menjaga kelangsungan hidupnya, gula tersebut terkandung dalam madu selain itu madu juga banyak mengandung Senyawa fenolik dan flavonoid merupakan senyawa yang secara umum telah diketahui sebagai senyawa antioksidan. Menurut Ferreira *dkk.* (2009), dalam madu lebih dari 150 senyawa polifenol mengandung flavonoid, asam fenolik, katekin, dan turunan asam sinamik yang merupakan senyawa-senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menghambat munculnya mikroorganisme pengganggu spermatozoa, Selain itu, alasan digunakannya madu sebagai sumber energi untuk spermatozoa, selain harga yang terjangkau ketersediaan madu cukup banyak dan mudah ditemukan.

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan madu pada pengencer berbagai spesies hewan seperti untuk mengencerkan semen kalkun dengan level penggunaan madu 3%, 4%, dan 5% (Sari *dkk.*, 2015), ikan Komet (Boedi *dkk.*, 2010), ikan Patin dengan level 2%, 4%, dan 6% (Arsetyo *dkk.*, 2012), Namun sampai saat ini pengaruh penambahan berbagai jenis madu untuk mengencerkan semen ayam kampung belum pernah dilakukan. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian ini. Tujuan Penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai level dan jenis madu monoflora terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dan mengetahui level dan jenis madu terbaik untuk mempertahankan kualitas spermatozoa ayam kampung.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial dengan perlakuan faktor pertama adalah level madu dalam pengencer yaitu A0 (kontrol), A1 (level 2%), A2 (level 4%) dan A3 (level 6%). Sedangkan faktor kedua adalah jenis madu monoflora yaitu B1 (madu randu), B2 (madu kaliandra) dan B3 (madu kopi).

Pengencer dasar yang digunakan dalam penelitian ini yaitu air kelapa dan kuning telur. Komposisi pengencer yang digunakan dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 1. Komposisi pengencer semen

Komponen	Perlakuan			
	A0	A1	A2	A3
Air kelapa (ml)	8,5	8,5	8,5	8,5
Kuning telur	1,5	1,3	1,1	0,9
Madu (ml)	0	0,2	0,4	0,6
<i>Penicilin</i> (IU/ml)	1000	1000	10000	1000
<i>Streptomycin</i> (mg/ml)	1	1	1	1

Prosedur pembuatan pengencer air kelapa dan kuning telur disentrifugasi dengan kecepatan 2.000 Rpm selama 20 menit, supernatan hasil sentrifugasi distirer selama 5 menit dengan pencampur *streptomyci*, *penicillin* dan madu. Pengencer yang sudah dibuat selanjutnya ditambahkan tris untuk menyesuaikan pH pengencer dengan pH semen, kemudian pengencer dihomogenkan. Koleksi semen dilakukan dengan metode pengurutan, semen yang telah dikoleksi selanjutnya diencerkan dengan perbandingan pengencer adalah 1:15. Semen yang telah diencerkan disimpan dalam *refrigerator* pada suhu 5 °C. Pengamatan motilitas diamati menggunakan mikroskop perbesaran 40x pada jam ke-0, 24, 48, 72, 96, dan 120. Penilaian motilitas spermatozoa dilakukan dengan membandingkan antara motilitas progresif maju ke depan dengan pergerakan motilitas tidak progresif dan tidak bergerak.

Data motilitas yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan model matematika sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  : Nilai Pengamatan

$\mu$  : Nilai Rataan Umum

$\alpha_i$  : Pengaruh Perlakuan

$(\alpha\beta)_{ij}$  : Interaksi Antara 2 Perlakuan Faktor

$\epsilon_{ijk}$  : Galat Percobaan

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis madu yang diberikan berpengaruh nyata ( $P < 0.05$ ) terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung pada penyimpanan 0 jam, 72 jam, 96 jam dan 120 jam (Tabel 2, 5, 6 dan 7). Rata-rata persentase motilitas tertinggi dengan penggunaan madu randu (B1) dan madu kaliandra (B2) yaitu 65.42%-68.75% pada jam ke-0, 51.67%-54.17% pada jam ke-72, 38.75%-42.92% pada jam ke-96 dan 19,83%-28.75% pada jam ke-120. Sedangkan persentase motilitas terendah pada penggunaan jenis madu kopi (B3). Hal ini disebabkan oleh tingginya kandungan antioksidan madu kaliandra yaitu 48,02 mg/ML sedangkan madu kopi (B3) yaitu 14,68 mg/ML (Chayati dan Miladiyah, 2014).

Tabel 2. Motilitas (%) spermatozoa ayam kampung penyimpanan jam ke-0

Level madu	Jenis madu			Rata-rata
	B1	B2	B3	
A0	80.00 ±	76.67 ±	70.00 ±	75.56±2,9 <sup>c</sup>
A1	0.00	1.67	5.77	65.56±4,0 <sup>bc</sup>
A2	60.00 ±	73.33 ±	63.33 ±	61.11±3,4 <sup>ab</sup>
A3	7.64	1.67	8.82	52.22±10,6 <sup>a</sup>
	55.00 ±	66.67 ±	61.67 ±	
	8.66	5.77	3.33	
	66.67 ±	58.33 ±	31.67 ±	
	3.33	9.25	7.26	
Rata-rata	65.42±5,4 <sup>b</sup>	68.75±4,0 <sup>b</sup>	56.67±8,5 <sup>a</sup>	

Keterangan: superskrip yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0.01$ ).

Tabel 3. Motilitas (%) spermatozoa ayam kampung penyimpanan jam ke-24

Level madu	Jenis madu			Rata-rata
	B1	B2	B3	
A0	76.67 ±	75.00 ±	65.00 ±	73.33±3,6 <sup>c</sup>
A1	1.67	2.89	7.64	62.78±3,9 <sup>bc</sup>
A2	56.67 ±	70.00 ±	61.67 ±	58.89±3,9 <sup>b</sup>
A3	6.67	2.89	12.02	45.00±12,7 <sup>a</sup>
	55,00 ±	55.00 ±	66.67 ±	
	10.41	7.50	8.82	
	61.67 ±	53.33 ±	20.00 ±	
	4.41	3.33	5.77	
Rata-rata	62,50±4,9	64.17±5,4	53.33±11,2	

Keterangan: superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ ).

Tabel 4. Motilitas (%) spermatozoa ayam kampung penyimpanan jam ke-48.

Level madu	Jenis madu			Rata-rata
	B1	B2	B3	
A0	71.67 ±	73.33 ±	63.33 ±	71.11±3,1 <sup>b</sup>
A1	1.67	1.67	8.82	60.00±3,3 <sup>ab</sup>
A2	53.33 ±	63.33 ±	63.33 ±	49.44±3,6 <sup>a</sup>
A3	8.33	3.33	10.93	47.78±7,2 <sup>a</sup>
	45.00 ±	56.67 ±	46.67 ±	
	10.41	3.82	6.67	
	55.00 ±	55.00 ±	33.33 ±	
	2.89	7.64	6.67	
Rata-rata	56.25±5,6	63.33±4,2	51.67±7,3	

Keterangan: superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,01).

Tabel 5. Motilitas (%) spermatozoa ayam kampung penyimpanan jam ke-72

Level madu	Jenis madu			Rata-rata
	B1	B2	B3	
A0	65.00 ±	68.33 ±	60.00 ±	65.00±2,9 <sup>b</sup>
A1	2.89	1.67	5.77	47.78±4,0 <sup>a</sup>
A2	45.00 ±	51.67 ±	46.67 ±	41.11±3,4 <sup>a</sup>
A3	10.41	4.41	9.28	41.11±10,6 <sup>a</sup>
	48.33 ±	40.00 ±	35 ± 10.41	
	4.41	5.00	20 ± 5.77	
	48.33 ±	55.00 ±		
	4.41	2.89		
Rata-rata	51.67±5,4 <sup>b</sup>	54.17±4,0 <sup>b</sup>	40.42±8,5 <sup>a</sup>	

Keterangan: superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perberbedaan yang nyata (P>0.05) namun pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0.01).

Tabel 6. Motilitas (%) spermatozoa ayam kampung penyimpanan jam ke-96

Level madu	Jenis madu			Rata-rata
	B1	B2	B3	
A0	50.00 ±	61.67 ±	56.67 ±	56.11±2,9 <sup>c</sup>
A1	5.77	4.41	4.41	35.00±7,1 <sup>b</sup>
A2	33.33 ±	50.00 ±	21.67 ±	28.89±5,9 <sup>ab</sup>
A3	3.33	5.77	4.41	25.00±5,8 <sup>a</sup>
	41.67 ±	26.67 ±	18.33 ±	
	7.26	2.89	6.01	
	30.00 ±	33.33 ±	11.67 ±	
	5.77	8.82	1.67	
Rata-rata	38.75±4,5 <sup>b</sup>	42.92±7,9 <sup>b</sup>	27.08±10,1 <sup>a</sup>	

Keterangan: superskrip yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0.01).

Tabel 7. Motilitas (%) spermatozoa ayam kampung penyimpanan jam ke-120.

Level madu	Jenis madu			Rata-rata
	B1	B2	B3	
A0	35 ± 7,64	48,33 ±	46,67 ±	43,33±4,2 <sup>b</sup>
A1	20 ± 5,77	6,01	3,33	18,33±7,3 <sup>a</sup>
A2	13,33 ±	30 ± 5,77	5,00 ± 2,89	16,11±2,6 <sup>a</sup>
A3	8,82	21,67 ±	13,33 ±	11,11±2,0 <sup>a</sup>
	10 ± 5,00	3,82	4,41	
		15 ± 2,89	8,33 ± 1,67	
Rata-rata	19,83±5,5 <sup>b</sup>	28,75±7,3 <sup>b</sup>	18,33±9,6 <sup>a</sup>	

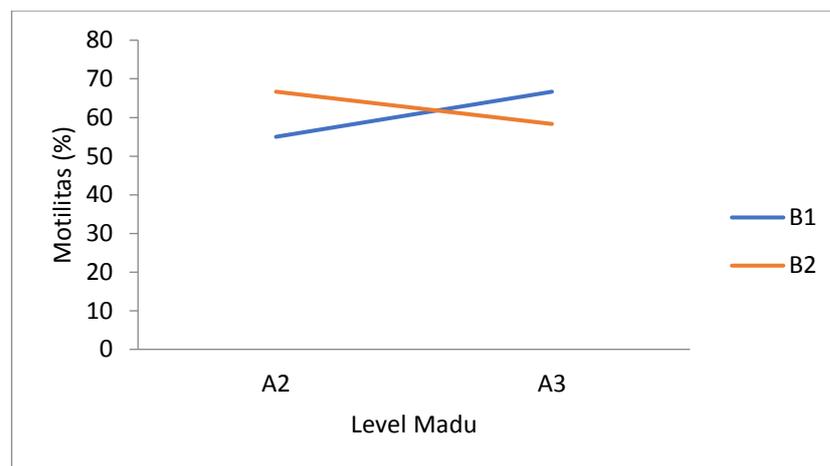
Keterangan: superskrip yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0.05$ ) sedangkan pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0.01$ ).

Penyimpanan 0 jam hingga 120 jam menunjukkan bahwa level madu yang diberikan berpengaruh sangat nyata ( $P < 0.01$ ) terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung (Tabel 2-7). Rata-rata persentase motilitas tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol (A0) dan perlakuan penambahan madu 2% (A1) dari penyimpanan 0 jam hingga penyimpanan 48 jam. Pada perlakuan tersebut, penyimpanan 0 jam diperoleh motilitas 65.56-75.56% , pada penyimpanan 24 jam diperoleh motilitas 62.78-73.33%, dan penyimpanan 48 jam diperoleh motilitas 60.01-71.11%. Penggunaan level madu 4% dan 6% dalam pengencer tidak menghasilkan perbedaan motilitas spermatozoa pada penyimpanan 0 jam, 48 jam, 72 jam, 96 jam, dan 120 jam. Madu adalah salah satu bahan yang berfungsi sebagai antioksidan karena mengandung vitamin C, vitamin E, komponen fenolik, flavonoid, asam askorbat, enzim glukosa oksidase dan enzim katalase.

Penambahan madu 6% mengalami penurunan yang lebih tinggi terhadap motilitas ayam kampung pada penelitian ini. Hal ini disebabkan oleh peningkatan glukosa serta senyawa antioksidan dalam jumlah banyak akan semakin meningkatkan tekanan osmotik larutan pengencer dan kurang dapat diadaptasi dengan baik oleh spermatozoa (Beconi *dkk*, 1993). Menurut hasil penelitian Banday *dkk* (2017) penggunaan madu level 5% dan 7% menurunkan motilitas spermatozoa pada domba. Terjadinya penurunan motilitas spermatozoa setelah proses pendinginan juga bisa disebabkan oleh pengaruh fisik saat perlakuan yang menyebabkan kematian. Pengaruh fisik tersebut diakibatkan oleh gesekan antar spermatozoa, antar spermatozoa dengan dinding tabung, atau antar globul lemak dari kuning telur sehingga menyebabkan kecenderungan penurunan motilitas seiring dengan tingkat pengenceran yang berbeda (Munazaroh, *dkk* 2013). Rendahnya motilitas dengan

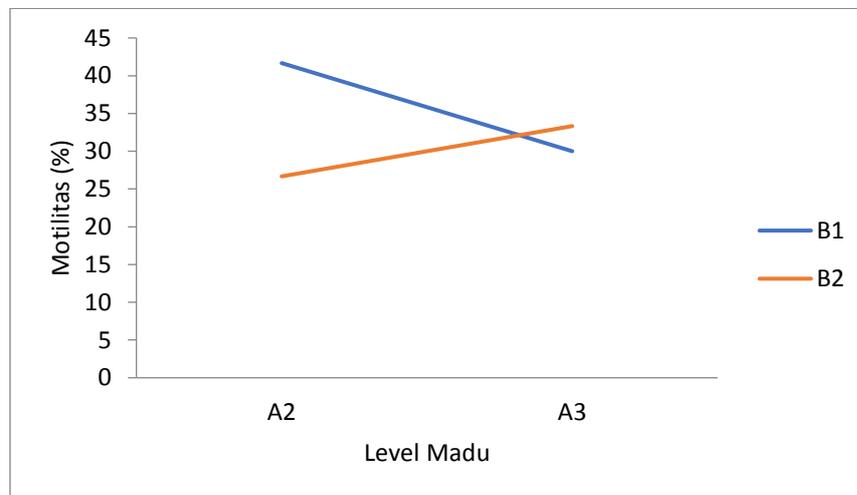
peningkatan level madu juga diduga karena tingginya osmolaritas madu (Nassar *dkk*, 2012; Kwakman *dkk*, 2010).

Madu merupakan larutan lewat jenuh (*supersaturated solutions*) dari karbohidrat, sehingga dikatakan medium hiperosmotik. Sekitar 84% padatan pada madu adalah campuran dari monosakarida, yakni fruktosa dan glukosa. Madu dengan persentase gula yang tinggi menyebabkan kondisi hipertonik yang dapat menyebabkan lisis dinding sel mikroba (Cushnie dan Andrew, 2011). Jika organisme bersel satu masuk ke dalam medium hiperosmotik ini, maka organisme tersebut dapat terbunuh karena kehilangan cairan tubuh akibat perbedaan tekanan osmosis yang besar. Tambahan pula interaksi yang kuat antara molekul-molekul gula dan molekul air menyebabkan sangat terbatasnya ketersediaan air untuk mikroba. Tekanan osmosis pada madu lebih besar dari 2.000 mOsm.



Gambar 1. Grafik interaksi level madu terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung pada penyimpanan 0 jam.

Grafik interaksi menunjukkan bahwa peningkatan level madu 4% (A2) hingga 6% (A3) menghasilkan peningkatan pada jenis madu randu (B1) namun mengalami penurunan pada madu kaliandra (B2).



Gambar 2. Grafik interaksi level madu dengan jenis madu terhadap motilitas spermatozoa ayam kampung pada penyimpanan 96 jam.

Grafik interaksi menunjukkan bahwa peningkatan level madu 4% (A2) hingga 6% (A3) menghasilkan peningkatan pada jenis madu randu (B1) namun mengalami penurunan pada madu kaliandra (B2).

Motilitas spermatozoa pada penelitian ini lebih tinggi dari penelitian sebelumnya pada pengencer ringer laktat dan susu skim yaitu 69.39% pada penyimpanan 0 jam (Nurlinda, 2018) namun lebih rendah dari hasil yang didapatkan oleh Khaeruddin dan Amir (2019) yaitu 85-86.25% menggunakan pengencer ringer laktat kuning telur dan glukosa 20-80mM.

Tabel 3 menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa ayam kampung pada penyimpanan 24 jam lebih tinggi dibanding penelitian sebelumnya oleh Dwitarizki *dkk*, (2015) menggunakan pengencer air kelapa dan aras kuning telur itik pada spermatozoa domba garut pada penyimpanan 24 jam didapatkan motilitas 56.67%. Motilitas yang diperoleh pada perlakuan A0 dan A1 (62.78-73.33%) hampir sama dengan yang didapatkan oleh Khaeruddin dan Srimaharani (2019) yaitu 69.87% menggunakan pengencer air kelapa dan susu skim 9% pada spermatozoa ayam kampung.

Motilitas spermatozoa dengan penyimpanan 48 jam pada perlakuan 2% madu dalam penelitian ini lebih tinggi dari penelitian sebelumnya pada spermatozoa kalkun menggunakan pengencer madu pada penyimpanan 48 jam yaitu 58,50% (Sari *dkk* 2014). Hasil penelitian motilitas spermatozoa pada penyimpanan 48 jam ini juga lebih tinggi dari

laporan Khaeruddin dan Srimaharani yaitu 43.73-49.70% pada spermatozoa ayam kampung menggunakan pengencer air kelapa dan susu skim 6-9%.

Motilitas spermatozoa yang disimpan 72 jam pada penelitian ini juga lebih tinggi penelitian sebelumnya pada pengencer air kelapa dan aras kuning pada spermatozoa domba garut yaitu 53,7 (Dwitarizki *dkk*, 2015). Rata-rata motilitas pada perlakuan B2 yang disimpan 96 jam dalam penelitian ini lebih tinggi dibanding penelitian sebelumnya menggunakan level madu di dalam pengencer tris kuning telur sperma domba lokal yaitu 40% pada penyimpanan 96 jam (Pratiwi *dkk*, 2015)

Pengaruh waktu penyimpanan menunjukkan penurunan motilitas spermatozoa. Hal ini membuktikan semakin lama penyimpanan maka spermatozoa yang mati semakin banyak akibat perubahan kondisi larutan pengencer dan menurunnya zat-zat makanan sebagai sumber energy (Solihati *dkk.*, 2006).

## KESIMPULAN

Penambahan berbagai level madu yang berbeda berpengaruh sangat nyata terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dan penggunaan level madu terbaik yaitu 2% sampai penyimpanan 48 jam. Penambahan madu dengan jenis yang berbeda berpengaruh nyata terhadap kualitas spermatozoa ayam kampung dan jenis madu yang baik yang digunakan yaitu madu kaliandra dan madu randu.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arsetyo Rahardhianto, Nurlita Abdulgani, Ninis Trisyani. 2012. Pengaruh konsentrasi larutan madu dalam nacl fisiologis terhadap viabilitas dan motilitas spermatozoa ikan patin (*pangasius pangasius*) selama masa penyimpanan. *J Sains dan Seni*. 1(1): 58-63.
- Banday, M.N., Lone F.A., Rasool, F., Rather, H.A., Rather, M.A. 2017. Does natural honey act as an alternative to antibiotics in the semen extender for cryopreservation of crossbred ram semen. *Iranian journal of veterinary research*. 18(4) : 258-253.
- Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affrachino MA. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40: 841-852.
- Boedi SRA, Mubarak S, Rini SP. 2010. Penambahan ekstender madu dalam proses penyimpanan sperma beku terhadap motilitas dan viabilitas spermatozoa ikan komet (*carassius auratus auratus*). *J Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, 2(2): 185-191.

- Cushnie, T. P, And Andrew J. Lamb.2011. Recent advances in understanding the bacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38(2) : 99-107
- Dwitarizki, N.D, Ismaya, Asmarawati,W. 2015. Pengaruh Pengenceran Sperma dengan Air Kelapa dan Aras Kuning Telur Itik serta Lama Penyimpanan Terhadap Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Domba Garut Pada Penyimpanan 5°C. *Buletin Peternakan*. 39 (3): 149-156.
- Ferreira, I.C.F.R. *dkk.*, 2009. *Antioxidant Activity of Portuguese Honey Samples: Different Contributions of the Entire Honey and Phenolic Extract*. *Food Chemistry* 114(4): 1438 -1443.
- Khaeruddin, Amir M. 2019. The effect of the combination of glucose concentration with the type of extenders on the quality of native rooster spermatozoa during storage. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*. 4(2):36-43.
- Khaeruddin, Srimaharani. 2019. Use of old coconut water with various skim concentrations of milk as a diluent for kampung chicken semen. *Chalaza Journal of Animal Husbandry*. 4(1): 6-12.
- Kwakman, P. H., Te Velde, A. A., De Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Zaat, S. A. 2010. How Honey Kills Bacteria. *The FASEB Journal*. 24(7) : 2576-2582.
- Munazaroh, A. M., Wahyuningsih ,S., Ciptadi, G. 2013. Uji Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Hasil Pembekuan Menggunakan MR.Frosty Pada Tingkat Pengenceran Andromed Berbeda. *Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya*. Malang.
- Nassar, H. M.,Li, M., & Gregory, R. L. (2012). Effect of honey on streptococcus mutans growth and biofilm formation. *Applied And Enviromental Microbiology*, 78(2) : 536-540
- Nurlinda, A. 2018. Motilitas Spermatozoa Ayam Kampung dalam Pengencer Ringer Laktat dan Susu Skim. *Skripsi*. Sekolah Tinggi Ilmu Pertanian Muhammadiyah Sinjai, Sinjai.
- Pratiwi, D. N, Soeparna, Solihati N. 2015. Pengaruh level madu di dalam pengencer tris kuning telur terhadap daya hidup dan keutuhan membran plasma sperma domba lokal. *Skripsi*. Universitas Padjajaran.
- Sari, N.M.D.P, Bebas, W. Trilaksana, I.G.N.B. 2015. Madu meningkatkan kualitas semen kalkun selama penyimpanan. *Buletin Veteriner Udayana*. 7(2): 164-171.
- Solihati N, Idi R, Setiawan R, Asmara IY, Sujana BI. 2006. Pengaruh lama penyimpanan semen cair ayam buras pada suhu 50 C terhadap periode fertil dan fertilitas sperma. *Jurnal Ilmu Ternak*, 6(1): 7–11.
- Suharyanto, A.A. 2007. *Panen Ayam Kampung dalam 7 Minggu Bebas Flu Burung*. Penebar Swadaya. Jakarta.