

## Penambahan Vitamin E Pada Pengencer BTS<sup>®</sup> Terhadap Daya Hidup Dan Motilitas Spermatozoa Babi Landrace Pada Penyimpanan 15°C

(THE ADDITION OF VITAMIN E IN DILUENT BTS<sup>®</sup> OF VIABILITY AND MORTALITY OF SPERMATOZOA LANDRACE PIG STORED IN TEMPERATURE 15°C)

Wayan Bebas<sup>1</sup>, Geovany Larastiyani Buyona<sup>2</sup>, Made Kota Budiasa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Reproduksi Veteriner Universitas Udayana

<sup>2</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana

Jl. PB. Sudirman Denpasar-Bali

Email: wayanbebas@yahoo.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hidup dan motilitas spermatozoa babi *Landrace* pada pengencer *Beltsville Thawing Solution*<sup>®</sup> (BTS) dengan penambahan vitamin E (*α-tokoferol*) yang disimpan pada suhu 15°C selama 96 jam. Semen yang digunakan berupa semen segar dari pejantan babi *Landrace* berusia dua tahun. Semen dikoleksi dengan metode *massage*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat kelompok perlakuan dengan masing-masing: kelompok I sebagai kontrol, kelompok II dengan penambahan 300 µg/ml VitaminE, kelompok III dengan penambahan 400 µg/ml VitaminE dan kelompok IV dengan penambahan 500 µg/ml VitaminE. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak enam kali disimpan pada suhu 15°C selama 96 jam. Hasil menunjukkan bahwa penambahan VitaminE berpengaruh nyata terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi *Landrace*. Penambahan vitamin E 400 µg/ml memberikan daya hidup dan motilitas terbaik selama penyimpanan pada suhu 15°C selama 96 jam. Simpulan dari penelitian ini adalah penambahan VitaminE 400 µg/ml dengan pengencer BTS<sup>®</sup> pada suhu 15°C selama 96 jam mampu meningkatkan daya hidup dan motilitas spermatozoa babi *Landrace*.

Kata kunci: penyimpanan spermatozoa, babi *Landrace*, daya hidup, motilitas, vitamin E.

### ABSTRACT

The aim of the study was to determine viability and motility spermatozoa of Landrace pigs in the *Beltsville Thawing Solution*<sup>®</sup> (BTS) diluents with the addition of vitamin E (*α-tokoferol*) that was stored at a temperature 15°C for 96 hours. The form of semen used a fresh semen from the male landrace pigs two years. Semen was collected by *massage* method. This study used completely randomized design with four treatment groups with each are treatment I as control, treatment II with addition 300 µg/ml VitaminE, treatment III with addition 400 mg/ml of vitamin E and treatment IV with addition 500 mg/ml of vitamin E. Each group was repeated six times and then stored at a temperature 15°C for 96 hours. The results showed that addition of vitamin E significantly on the viability and motility spermatozoa of Landrace pigs. The addition of vitamin E 400 µg/ml gave the preeminent of viability and motility during storage at a temperature 15°C for 96 hours. This study concluded that the addition of vitamin E 400 µg/ml in BTS<sup>®</sup> diluents at 15°C for 96 hours was able to increase the viability and motility spermatozoa of Landrace pigs.

Keywords: stored of spermatozoa, Landrace pig, viability, motility, vitamin E

## PENDAHULUAN

Peningkatan jumlah penduduk menyebabkan kebutuhan akan sumber makanan yang memiliki gizi yang baik pun meningkat. Salah satu sumber gizi yang paling penting adalah protein yang berasal dari hewan. Babi *landrace* adalah salah satu babi yang banyak dipelihara di Indonesia khususnya Provinsi Bali. Ternak babi merupakan salah satu sumber gizi dan sumber daging yang bernilai ekonomi cukup tinggi, karena memiliki kemampuan beranak yang baik yakni dua kali dalam setahun, pertumbuhan yang cepat, kemampuan membalikkan modal cukup tinggi, efisien dalam menggunakan pakan (75-80%), proporsi karkasnya tinggi (65-80%), limbah yang dihasilkan dapat dijadikan sebagai pupuk, sumber energi bio gas, dan pakan ikan (Aritonang, 1993).

Sejalan dengan peningkatan populasi maka penggunaan inseminasi buatan (IB) pada babi di masyarakat juga semakin luas. Keberhasilan penerapan IB sangat dipengaruhi oleh kualitas semen, untuk itu perlu dilakukan pengolahan semen yang meliputi pengenceran dan penyimpanan semen. Bahan pengencer semen memiliki beberapa persyaratan yakni menyediakan zat makanan sebagai sumber energi spermatozoa, mampu mencegah kejutan dingin, mengandung zat yang dapat menghentikan atau menghambat aktivitas bakteri yang terdapat dalam semen, berperan sebagai penyangga (buffer) untuk mencegah perubahan pH serta dapat mempertahankan keseimbangan tekanan osmotik dan elektrolit.

Pengencer *Beltsville Thawing Solution*<sup>®</sup> (BTS) merupakan salah satu pengencer yang sudah diperjualbelikan secara luas yang dapat mempertahankan motilitas spermatozoa selama proses penyimpanan pada suhu dingin sehingga aktivitas metabolisme selama proses penyimpanan dapat dikurangi, dapat

mengatasi kapasitas dini dengan mengikat kalsium yang merupakan mediator utama terjadinya proses kapasitas (Thomson, 2005). Dilihat dari komposisinya, BTS belum mempunyai kandungan bahan yang mampu memproteksi sel spermatozoa terhadap serangan radikal bebas yang sering juga disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS). ROS terbentuk dari aktivitas metabolisme sel selama prosesing semen mulai pada saat penampungan, pengenceran dan penyimpanan (Chatterjee *et al.*, 2001). ROS sangat berbahaya bagi kehidupan sel karena mampu bereaksi dengan fosfolipid penyusun membran plasma sel sehingga mengakibatkan hilangnya integritas membran, inaktivasi enzim, kerusakan struktur DNA, dan kematian sel (Hsieh *et al.*, 2006).

Dalam proses penyimpanan semen pada suhu dingin akan mengalami peristiwa kejutan dingin (*cool shock*) dan serangan radikal bebas. Kejutan dingin (*cool shock*) dan radikal bebas dapat mengakibatkan penurunan terhadap kualitas semen berupa penurunan motilitas dan daya hidup spermatozoa. Untuk meminimalkan kerusakan sel spermatozoa akibat dari kejutan dingin (*cool shock*) tersebut maka dapat ditambahkan antioksidan kedalam pengencer.

Vitamin E ( *$\alpha$ -tokoferol*) merupakan antioksidan yang larut dalam lemak yang dapat menghentikan lipid peroksida membran plasma selama proses pendinginan (Breininger *et al.*, 2005). vitamin E mempunyai kemampuan memutus rantai reaksi peroksidasi atau menangkap radikal bebas dengan cara bereaksi secara langsung dengan berbagai radikal peroksi organik sehingga mencegah terjadinya reaksi berantai dan dapat menekan terjadinya kerusakan peroksidatif yang berpengaruh terhadap kualitas semen babi. Dalam mempertahankan mutunya, semen babi disimpan pada suhu 15-20°C karena akan

berpengaruh terhadap struktur fosfolipida membran plasma spermatozoa.

Sumardani *et al.* (2008) telah mencoba menggunakan pengencer BTS pada babi dengan berbagai penyimpanan yang berbeda. Semen yang diencerkan dengan pengencer BTS pada suhu 18°C menunjukkan daya hidup dan motilitas spermatozoa berkisar di atas 50% selama 24 jam. Menurut Suharyati dan Hartono (2013), telah mencoba pemberian vitamin E dan mineral Zn terhadap kualitas semen kambing boer, dapat mempertahankan motilitas spermatozoa dan meningkatkan kualitas semen.

Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian untuk menambahkan berbagai konsentrasi vitamin E kedalam pengencer BTS yang disimpan pada suhu 15°C terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi *landrace* selama 96 jam.

## METODE PENELITIAN

### Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan satu ekor babi jantan jenis *Landrace*. Vitamin E, pengencer BTS (Minitube, Germany) dan eosin negrosin sitrat. Alat yang digunakan gelas objek beserta penutupnya, mikroskop binokuler dan *water bath*.

### Metode Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari empat kelompok masing-masing: kelompok I sebagai kontrol yang berisi pengencer BTS tanpa vitamin E, kelompok II menggunakan bahan pengencer BTS ditambah vitamin E 300 µg/ml, kelompok III menggunakan bahan pengencer BTS ditambah vitamin E 400 µg/ml dan kelompok IV menggunakan bahan pengencer BTS ditambah vitamin E 500 µg/ml.

Sumber semen berasal dari seekor

babi jantan bangsa *Landrace*, dalam kondisi sehat berumur dua tahun, dan mempunyai volume 160 ml, konsentrasi spermatozoa 266 x 10<sup>6</sup> sel/ml, daya hidup 96% serta motilitas 80%. Penampungan semen dilakukan dua kali seminggu, dengan metode *massage*. Semen yang diperoleh dievaluasi secara makroskopis dan mikroskopis, meliputi pemeriksaan volume (ml), warna, pH, dan pemeriksaan konsistensi atau kekentalan, konsentrasi spermatozoa (10<sup>6</sup> sel/ml) dan persentase sperma motil (M%). Semen yang telah dievaluasi dan memenuhi syarat, diencerkan dengan perbandingan satu bagian semen dan tiga bagian pengencer. Asumsi yang digunakan berdasarkan dosis inseminasi yakni konsentrasi spermatozoa motil mencapai 2000-3000 x 10<sup>6</sup> sel dalam 80 ml (Sumardani *et al.*, 2008). Kemudian semen diberikan Vit E yang disimpan pada suhu 15°C selama 96 jam. Dilakukan pengamatan terhadap daya hidup dan motilitas setiap 24 jam serta pengaruh lama waktu penyimpanan terhadap daya hidup dan motilitas.

### Pengamatan Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa

Pengamatan terhadap daya hidup dan motilitas dilakukan selama 96 jam dengan interval pengamatan 24 jam. Pengamatan terhadap daya hidup spermatozoa dilakukan dengan menggunakan pewarnaan eosin negrosin sitrat. Sampel diambil satu tetes (0,05 ml) yang diteteskan pada gelas objek kemudian ditambah eosin negrosin sitrat dua tetes selanjutnya dibuat preparat hapusan dan diangin-anginkan sampai kering, kemudian preparat diperiksa dibawah mikroskop untuk menghitung jumlah spermatozoa yang masih utuh beserta membran plasma utuhnya. Penilaian dilakukan dengan sistem skor 0% sampai 100%. Persentase hidup (%) adalah persentase spermatozoa yang hidup dihitung dan dievaluasi

menggunakan zat pewarna eosin negrosin sitrat. Spermatozoa yang hidup tidak berwarna, sedangkan yang mati akan berwarna merah. Hal ini karena mekanisme pompa natrium yang masih stabil, sedangkan pada spermatozoa yang sudah mati pompa natrium sudah berhenti yang menyebabkan kepala spermatozoa berwarna merah.

Pengamatan terhadap motilitas dilakukan dengan cara semen diteteskan diatas gelas objek dan ditutup, selanjutnya diperiksa dibawah mikroskop. Penilaian persentase motilitas didasarkan pada persentase spermatozoa yang bergerak progresif pada beberapa lapang pandang. Ditentukan secara subjektif dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Angka yang diberikan antara 0-100%, sedangkan pengamatan terhadap daya hidup dilakukan dengan pewarnaan eosin negrosin sitrat dengan cara semen diambil sebanyak 0,05 ml diletakkan pada gelas objek kemudian diteteskan pewarna eosin negrosin sitrat pada semen, selanjutnya dibuat preparat hapusan dan dianginkan sampai kering.

Preparat diperiksa di bawah mikroskop binokuler dengan pembesaran 1000x untuk menghitung jumlah spermatozoa yang tidak menyerap warna (transparan) sebagai tanda spermatozoa masih hidup.

### Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis varian (Anava) selanjutnya dilakukan pengujian statistik dengan menggunakan *General Linear Model (Multivariate)*. Untuk pengujian normalitas menggunakan *Kolmogorove-Smirnov Z*, sedangkan untuk pengujian homogenitas menggunakan *Levene's test*. Apabila terjadi perbedaan yang nyata pada perlakuan maka dilakukan dengan uji lanjutan dengan menggunakan uji *Duncan*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian daya hidup spermatozoa akibat pengaruh penambahan vitamin E yang disimpan pada suhu 15°C selama 96 jam dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata persentase daya hidup spermatozoa babi *landrace* pada pengencer BTS dengan penambahan vitamin E yang disimpan pada suhu 15°C setiap 24 jam

Perlakuan	Pengamatan Daya Hidup Spermatozoa				
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Kelompok I	96,00 ± 0	95,50 ± 0,548	92,17 ± 1,722	85,67 ± 2,251	70,00 ± 4,472
Kelompok II	96,00 ± 0	95,83 ± 0,408	93,50 ± 1,049	88,67 ± 1,751	74,00 ± 4,050
Kelompok III	96,00 ± 0	95,83 ± 0,408	94,33 ± 0,816	90,83 ± 1,169	84,50 ± 1,871
Kelompok IV	96,00 ± 0	95,50 ± 0,548	94,50 ± 0,548	90,83 ± 1,472	85,00 ± 2,366

Hasil menunjukkan bahwa lama waktu penyimpanan berpengaruh terhadap penurunan daya hidup spermatozoa babi. Waktu pengamatan 0 jam, 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam terlihat terjadi penurunan daya hidup spermatozoa babi yang nyata ( $P < 0,05$ ). Grafik daya hidup spermatozoa babi *Landrace* akibat penambahan vitamin E dan lama waktu penyimpanan dapat

dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan analisis ragam yang dilakukan tampak bahwa penambahan vitamin E pada sperma yang diencerkan dengan menggunakan BTS berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi *landrace*. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan vitamin E pada pengencer BTS dapat mempertahankan daya hidup dan

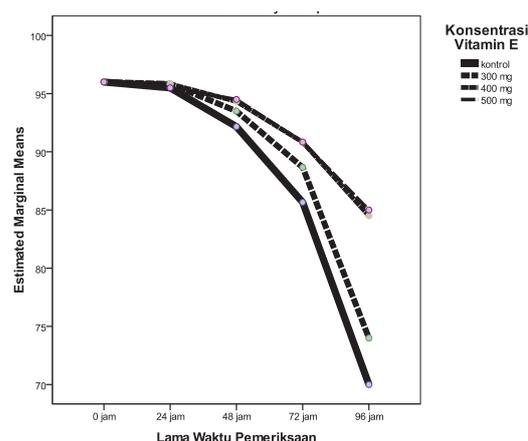
spermatozoa babi *landrace* yang disimpan pada suhu 15°C selama 96 jam.

Dalam proses inseminasi buatan diperlukan pengolahan semen agar dapat disimpan dan digunakan dalam waktu yang cukup lama. Selama proses pengenceran dan penyimpanan, masalah yang paling sering timbul adalah rusaknya membran plasma semen akibat terbentuknya peroksida lipid. Keadaan ini terjadi karena membran semen banyak mengandung asam lemak tak jenuh yang sangat rentan terhadap kerusakan peroksidasi (Maxwell dan Watson, 1996).

Menurut Alvarez dan Storey (1982), peroksida lipid terjadi pada semen yang disimpan lama dan dapat menurunkan motilitas dan daya hidup semen yang berpengaruh pengawetan semen. Untuk menghambat reaksi peroksida lipid maka dapat dilakukan penambahan antioksidan seperti vitamin E. Menurut Beconi *et al.* (1993) vitamin E terbukti dapat melindungi membran plasma semen sapi selama pembekuan sampai pencairan kembali.

Menurut Hsieh *et al.* (2006) bahwa daya fertilitas optimal dari spermatozoa dapat dipertahankan beberapa lama sesudah penampungan dengan cara menambah bahan pengencer yang dapat menjamin kebutuhan fisik dan kimia semen. Serta pemberian antioksidan yang tepat memberikan hasil yang maksimal untuk mencegah peroksidasi lipid pada

membran plasma spermatozoa dengan cara mencegah atau memutus reaksi rantai peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa, sehingga mampu mengurangi kerusakan yang terjadi pada membran plasma spermatozoa. Membran yang utuh akan menyebabkan proses metabolisme dapat berjalan dengan baik, sehingga energi yang dihasilkan maksimal.



Gambar 1. Grafik persentase daya hidup spermatozoa akibat pengaruh vitamin E dan lama waktu penyimpanan

Uji normalitas dengan menggunakan uji Kolmogrov-Smirnov dan homogenitas dengan menggunakan uji Levene's terhadap motilitas spermatozoa babi dengan penambahan Vitamin E yang disimpan pada suhu 15°C selama 96 jam dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa babi *landrace* pada pengencer BTS dengan penambahan vitamin E yang disimpan pada suhu 15°C setiap 24 jam

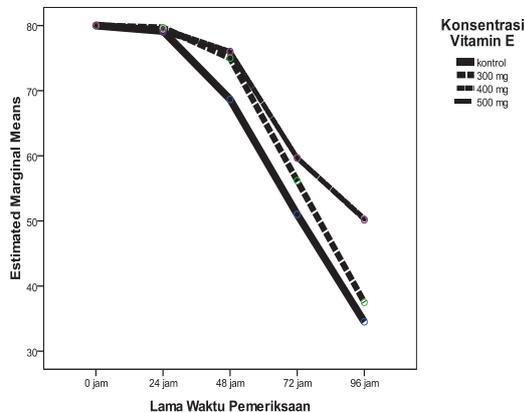
Perlakuan	Pengamatan Motilitas Spermatozoa				
	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam	96 jam
Kelompok I	80,00 ± 0	79,17 ± 0,983	68,67 ± 4,179	51,00 ± 2,280	34,50 ± 3,937
Kelompok II	80,00 ± 0	79,67 ± 0,516	75,00 ± 1,789	56,17 ± 3,061	37,50 ± 4,370
Kelompok III	80,00 ± 0	79,50 ± 0,873	76,00 ± 2,366	59,67 ± 3,011	50,33 ± 3,777
Kelompok IV	80,00 ± 0	79,00 ± 0,894	76,00 ± 1,673	59,67 ± 3,559	50,17 ± 4,446

Hasil menunjukkan bahwa lama penyimpanan berpengaruh terhadap penurunan motilitas spermatozoa babi.

Waktu pengamatan 0 jam dan 24 jam, 48 jam, 72 jam dan 96 jam terlihat terjadi penurunan motilitas spermatozoa yang

nyata ( $P < 0,05$ ). Grafik motilitas spermatozoa babi *Landrace* akibat penambahan vitamin E dan lama waktu penyimpanan dilihat pada Gambar 2.

Pada uji wilayah berganda Duncan terlihat bahwa vitamin E berpengaruh nyata ( $P < 0,05$ ) dalam mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa pada konsentrasi 400  $\mu\text{g/ml}$  dan 500  $\mu\text{g/ml}$ . Daya hidup dan motilitas spermatozoa dapat dipertahankan oleh pengencer BTS dan vitamin E selama proses penyimpanan. Sebab didalam BTS mengandung *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) yang berfungsi mengikat aktivitas kalsium sebagai media kapisitasi dini. Potassium yang menjaga fungsi transportasi ion metabolisme dan glukosa sebagai sumber energi yang dapat melindungi spermatozoa dari kejutan dingin. Sedangkan vitamin E dapat menghambat terjadinya proses peroksida lipid dengan cara memindahkan atom hidrogen kepada radikal peroksil.



Gambar 2. Pengaruh penambahan vitamin E dan lama waktu penyimpanan terhadap motilitas sperma

Menurut Hartono (2008) prinsip kerja dari antioksidan dalam menghambat otoolsidasi pada lemak dapat dilihat sebagai berikut: oksigen bebas di udara akan mengoksidasi ikatan rangkap pada asam lemak yang tidak jenuh, kemudian radikal bebas yang terbentuk akan beraksi dengan oksigen sehingga akan menghasilkan peroksida aktif. Apabila dalam suatu asam lemak yang terdapat di

dalamnya tidak mengandung antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan ikatan rangkap lemak. Apabila ditambah suatu antioksidan, maka peroksida aktif akan bereaksi dengan antioksidan tersebut. Sehingga pembentukan radikal bebas dapat dihentikan dengan penambahan suatu antioksidan.

Semakin banyak vitamin E yang ditambahkan dalam pengencer maka motilitas spermatozoa semakin baik karena proses peroksidasi lipid yang terjadi dihambat dengan adanya vitamin E dengan cara mentranfer atom hidrogennya ke radikal peroksil. Menurut Hartono (2008) penambahan vitamin E pada konsentrasi 500  $\mu\text{g/ml}$  memberikan hasil yang terbaik dalam mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa kambing boer. Menurut Long dan Kramer (2003) konsentrasi 40  $\mu\text{g/ml}$  vitamin E dapat meningkatkan kualitas spermatozoa kalkun secara signifikan ( $P < 0,05$ ). Menurut Setiawati (2013) mendapatkan bahwa penambahan vitamin E pada konsentrasi 400  $\mu\text{g/ml}$  memberikan hasil yang terbaik dalam mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa kalkun yang diencerkan dengan pengencer kuning telur fosfat selama 72 jam. Sama halnya penelitian pada babi *landrace* pada konsentrasi 400 – 500  $\mu\text{g/ml}$  juga menunjukkan hasil terbaik dalam mempertahankan daya hidup dan motilitas spermatozoa (Long dan Kramer, 2003).

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Penambahan vitamin E dan lama penyimpanan berpengaruh terhadap daya hidup dan motilitas spermatozoa babi. Dosis vitamin E 400  $\mu\text{g/ml}$  pada pengencer BTS merupakan dosis terbaik dalam mempertahankan daya hidup dan motilitasnya spermatozoa babi

## Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui fertilitas semen yang diencerkan menggunakan BTS dengan penambahan vitamin E.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam proses penelitian di Laboratorium Reproduksi Veteriner Universitas Udayana, keluarga serta teman-teman seperjuangan yang telah bersedia membantu dalam proses penelitian dan penulisan ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aritonang. 1993. Beternak babi. Penerbit Mutiara, Jakarta.
- Alvarez JG, Storey BT. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 42: 334-345.
- Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchino MA. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*, 40: 841-851.
- Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM. 2004. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63: 2126-2135.
- Chatterjee S, De Lamirande, Gagnon E. 2001. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol Reprod Dev*, 60: 498-506.
- Hartono M. 2008. Optimalisasi penambahan vitamin E dalam pengencer sitrat kuning telur untuk mempertahankan kualitas semen kambing boer. *J Indonesian Trop Anim Agric*, 33: 1-9.
- Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. 2006. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci*, 2: 23-29.
- Long JA, Kramer M. 2003. Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *J Poult Sci*, 82(11): 1802-1807.
- Maxwell WMC, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 42: 55-56.
- Setiawati DAFR. 2013. Penambahan vitamin E pada pengencer kuning telur fosfat terhadap motilitas dan daya hidup semen kalkun selama penyimpanan pada suhu 5°C. (Skripsi). Fakultas Kedokteran Hewan UNUD, Denpasar.
- Suharyati S, Hartono M. 2013. Peningkatan kualitas semen kambing boer dengan pemberian vitamin E dan mineral Zn. *J Kedokteran Hewan*, 7: 91-93.
- Sumardani NLG, Tuty LY, Pollung HS. 2008. Viabilitas spermatozoa babi dalam pengencer beltsville thawing solution (BTS) pada tiga tempat penyimpanan berbeda. *Media Peternakan*, 31: 81-86.
- Thompson LH. 2005. *Managing swine reproduction*. Univ. of Illinois. Urban