

**Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawa dalam Berbagai Macam Pengencer****The Quality of Etawa Goat-Breed's Frozen Semen in Various Types of Diluent****<sup>1</sup>Rosida Achlis, <sup>2</sup>Husni Anwar, <sup>2</sup>Sri Hidanah, <sup>2</sup>Pudji Sianto.**<sup>1</sup>PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampuc C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya – 60115

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993014

Email : vetunair@telkom.net

**Abstract**

This research was aimed to determine the effect of dilution egg yolk skim, egg yolk tris, and AndroMed<sup>®</sup> diluent to the quality of etawa goat-breed's frozen semen. This research used fresh samples of etawa goat-breed's semen collected in the artificial vagina then were divided into 3 treatment, egg yolk skim (P1), egg yolk tris (P2), and AndroMed<sup>®</sup> (P3). Then performed the freezing process. Then do the quality check include the percentage of spermatozoa's motility, viability, and sperm membrane integrity after freezing. Data were analyzed with Anova method (analysis of variance) followed by tukey test. The obtained result showed that there was significant difference between treatments ( $P < 0,05$ ). In this research, the highest percentage of motility, viability, or sperm membrane integrity was obtained from AndroMed<sup>®</sup>.

**Keywords :** frozen semen quality, etawa goat-breed's, semen diluents.**Pendahuluan**

Meningkatnya tingkat pendapatan penduduk dan kemajuan pembangunan serta makin bertambahnya pengertian masyarakat tentang arti dan peranan gizi bagi kesehatan, kebutuhan akan gizi semakin meningkat pula. Sumber protein hewani untuk pemenuhan gizi salah satunya adalah kambing peranakan etawa (PE) yang termasuk kambing penghasil susu yang potensial.

Populasi kambing PE di Indonesia hingga kini baru mencapai 3,9 juta ekor atau 30% dari total jumlah ternak nasional yang mencapai 13 juta ekor. Potensi nilai jual kambing ini cukup bagus karena nilai gizi susu kambing etawa yang tinggi, maka dari itu pemerintah berusaha meningkatkan populasi ternak kambing etawa sehingga dapat memenuhi permintaan ekspor susu kambing (Lestari, 2010).

Menurut Rizal (2008), salah satu cara yang dilakukan untuk meningkatkan populasi dan produktifitas ternak adalah melalui penerapan bioteknologi reproduksi yaitu Inseminasi Buatan (IB).

Penerapan teknologi IB pada kambing hingga saat ini masih belum sesuai dengan yang diharapkan dan ini ditandai dengan angka kebuntingan yang rendah. Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa angka kebuntingan pada kambing yang diperoleh dengan menggunakan semen beku bervariasi dari 40-46% (Ritar *et al.*, 1990; Ritar and Ball, 1993).

Semen beku berkualitas rendah merupakan salah satu faktor penyebab rendahnya angka kebuntingan pada kambing. Proses pembuatan semen beku mulai dari penampungan, pengenceran, ekuilibrasi, dan penyimpanan dalam wadah berisi nitrogen cair mengalami serangkaian perubahan, yaitu perubahan suhu, perubahan tekanan osmotik, dan pembentukan serta pelarutan es pada lingkungan ekstraseluler (Watson, 2000).

Proses IB memerlukan kualitas dan kuantitas semen yang baik serta waktu inseminasi yang tepat, jika kualitas semen bagus, semen segar yang baru ditampung dan sudah dinilai, dapat segera diencerkan dengan bahan pengencer yang sesuai untuk penyimpanan sehingga sewaktu-waktu dapat

dipakai. Kualitas semen akan menurun jika penyimpanan tidak ditambah dengan bahan pengencer yang tepat (Hafez, 2000). Semen yang tidak diencerkan akan sukar mempertahankan hidupnya lebih dari 24 jam, walaupun disimpan dalam suhu yang rendah. Tujuan pengenceran semen antara lain adalah untuk meningkatkan volume semen dan supaya semen dapat disimpan lama tanpa mengurangi kesuburannya (Hardijanto dkk, 2008).

Bahan pengencer yang memenuhi syarat adalah salah satu masalah penting dalam inseminasi buatan. Beberapa syarat pengencer yang baik adalah mampu mempertahankan pH semen, mencegah terjadinya *cold shock* (kejutan dingin) pada spermatozoa dalam suhu rendah serta mengandung bahan nutrisi (Toelihere, 1993).

Komponen dasar pengencer semen yang biasa digunakan antara lain susu skim dan tris. Bahan pengencer tersebut biasanya ditambahkan kuning telur serta tambahan lainnya. Selain pengencer semen yang dapat dibuat berdasarkan resep, terdapat berbagai pengencer komersial yang dapat diperoleh di pasaran seperti *Biochiphos* dan *Bioexcel* (IMV, Perancis) juga *Triladyl*, *Biladyl*, Tris dan pengencer AndroMed® (Minitube Jerman) yang menggunakan lesitin dari kacang kedelai.

#### Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Semen Beku Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga, Desa Tanjung, Kedamean, Gresik dan Laboratorium invitro Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang dilaksanakan pada bulan Agustus sampai September 2010.

Penelitian ini menggunakan sampel semen kambing peranakan etawa, yang semennya dapat diproses menjadi semen beku di Taman Ternak Pendidikan Universitas Airlangga. Kambing jantan yang digunakan berjumlah satu ekor, berumur  $\pm 2$  tahun dan mempunyai berat badan sekitar 60 kg, yang secara klinis dinyatakan sehat dan mempunyai libido yang baik, dan sebagai pemancing digunakan satu ekor kambing betina.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah vagina buatan, tabung penampung semen berskala, tabung reaksi, satu unit kontainer nitrogen cair, tabung erlenmeyer, spektrofotometer, spatula,

aluminium foil, gunting, *water bath*, *cool top*, thermometer, gelas beker, straw, timbangan, rak tabung reaksi, bunsen, kertas pH, gelas obyek, gelas penutup, *filling and sealing machine*, mikropipet, *water incubator*, alkohol, mikroskop, goblet dan canister.

#### Metode Penelitian

Pengambilan air mani kambing PE dilakukan dua kali yaitu pada hari Rabu dan Sabtu di Taman Ternak Pendidikan, Universitas Airlangga. Sebelum pengambilan semen, dilakukan pencucian pada preputium menggunakan sabun dan air hangat untuk membilasnya. Segera setelah penampungan semen dilakukan pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis spermatozoa meliputi : volume, warna, bau, pH, dan kekentalan. Dilanjutkan dengan pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan massa, gerakan individu, konsentrasi spermatozoa dengan metode spektrofotometer.

#### Persiapan Bahan Pengencer

Pengencer skim kuning telur menggunakan bahan susu skim, aquabides, antibiotik, kuning telur, dan gliserol. Pengencer tersebut dibagi menjadi 2 bagian yaitu pengencer A dan pengencer B. Pengencer A terdiri dari *buffer*, antibiotik dan kuning telur. Pengencer B terdiri dari *buffer*, antibiotik, gliserol 13%, kuning telur, dan glukosa.

Pengencer tris kuning telur terdiri tris aminomethane, asam sitrat, laktosa, raffinose, aquadest, kuning telur, dan antibiotik. Pengencer tersebut dibagi menjadi 2 bagian yaitu pengencer A dan pengencer B. Pengencer A tanpa gliserol, pengencer B ditambah gliserol 12%.

AndroMed® diencerkan dengan aquabides dan dapat langsung digunakan dengan perbandingan 1:4 misalnya 20 ml AndroMed® ditambahkan dengan 80 ml aquabides (untuk pembuatan pengencer 100ml). Semen yang sudah dicampur AndroMed® langsung dimasukkan ke dalam *cool top* sampai suhu 3-5°C, kemudian dilanjutkan proses selanjutnya.

#### Pemeriksaan Motilitas Setelah Pembekuan Semen

Pemeriksaan *Post Thawing Motility* (PTM) atau pencairan kembali setelah pembekuan dilakukan pemeriksaan di bawah

mikroskop dengan pembesaran 40 x 10 yaitu melihat berapa besar persentase motilitas progresif. Semen beku yang akan diperiksa terlebih dahulu di thawing yaitu dengan cara dimasukkan ke dalam *water bath* yang bersuhu 37-38°C selama 15 detik. Gunting kemasan semen beku pada ujung dan juga sedikit pada bagian tengahnya, kemudian teteskan (1 tetes) ke gelas objek yang telah dibersihkan dengan alkohol 70%. (Dirjennak, 2007), tutup dengan gelas penutup dan diamati motilitas spermatozoa menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x. Gerakan individu spermatozoa dengan gerak progresif yang dihitung persentasenya. Standar minimal persentase PTM 30% untuk kerbau dan kambing.

#### Pemeriksaan Persentase Hidup (Viabilitas) Spermatozoa Setelah Pembekuan

Pemeriksaan spermatozoa yang hidup dengan cara membuat preparat ulas. Semen ditetaskan pada bagian ujung gelas objek, kemudian teteskan zat warna eosin negrosin dicampur sampai homogen. Ambil gelas penutup, tempelkan bagian ujung pada campuran semen, kemudian dengan posisi miring bersudut lancip dorong sepanjang gelas objek yang telah disiapkan untuk mendapatkan selapis semen yang telah diwarnai setipis mungkin, selanjutnya dikeringkan dengan meletakkannya di atas api

Perhitungan dilakukan dengan rumus :

$$\text{Sperma normal} : \frac{\text{Sperma yang menggembung}}{\text{Total sperma}} \times 100\%$$

Dalam penelitian ini ada tiga perlakuan. Perlakuan tersebut adalah :

1. Perlakuan 1 (P1) terdiri dari semen ditambah pengencer skim kuning telur.
2. Perlakuan 2 (P2) terdiri dari semen ditambah pengencer tris kuning telur.
3. Perlakuan 3 (P3) terdiri dari semen ditambah pengencer AndroMed®

#### Analisis Data

Rancangan penelitian yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan dan enam ulangan. Penentuan ulangan berdasarkan rumus  $t(n-1) \geq 15$ . Data dianalisis menggunakan ANOVA yang akan dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur (BNJ) dengan taraf signifikan 5% (Kusriningrum, 2009).

bunsen sampai kering. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan mikroskop pembesaran 10 x 40. Spermatozoa dengan bagian kepala tidak berwarna adalah spermatozoa hidup sedangkan bagian kepala yang berwarna merah muda merupakan spermatozoa yang mati. Pemeriksaan dilakukan pada 5 lapangan pandang yang berbeda sampai memperoleh jumlah total 100 spermatozoa, kemudian baru dihitung persentase hidup spermatozoa.

#### Pemeriksaan Keutuhan (Integritas) Membran Plasma

Sebanyak 0,1 ml semen yang telah diencerkan, ditambahkan dengan 0,9 ml larutan hypoosmotik. Sperma yang telah tercampur dengan larutan hypoosmotik diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> 5% bersuhu 38,5 °C selama 60 menit. Setelah diinkubasi larutan yang tercampur ditetaskan sebanyak 0,2 ml pada gelas obyek kemudian dilakukan pewarnaan spermatozoa dengan larutan giemsa. Amati preparat pada mikroskop dan lihat sperma yang menggembung dan tidak menggembung. Spermatozoa yang menggembung dan tidak menggembung diidentifikasi dengan berubahnya bentuk ekor spermatozoa kemudian dihitung jumlah sel yang menggembung pada 10 kali lapang pandang pada mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

#### Hasil dan Pembahasan

##### Motilitas Spermatozoa Kambing PE Setelah Pembekuan

Pemeriksaan awal secara makroskopis dan mikroskopis (Lampiran 7 dan 8) semen dinyatakan layak untuk diproses menjadi semen beku. Berdasarkan uji Anova (*analysis of variant*) pada Lampiran 9 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0.01$ ) antar pengencer terhadap motilitas spermatozoa setelah pembekuan. Untuk mengetahui motilitas yang tertinggi dan terendah maka dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Tabel 1 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Motilitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa Setelah Pembekuan :

| Perlakuan | Motilitas % ( $\bar{X} \pm SD$ ) |
|-----------|----------------------------------|
| P1        | 30,00 <sup>a</sup> $\pm$ 5,48    |
| P2        | 36,67 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,16   |
| P3        | 42,50 <sup>b</sup> $\pm$ 4,18    |

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ).

Adanya perbedaan diantara 3 pengencer disebabkan karena masing-masing pengencer mempunyai komponen-komponen berbeda (Lampiran12).

Pengencer skim kuning telur, kuning telur yang terdapat ion sitrat berikatan Ca yang terdapat dalam plasma semen, sehingga akan menghilangkan fungsi Ca sebagai pemacu motilitas. Seperti pendapat Fleig yang dikutip oleh Salisbury dan Van Denmark (1985) yang menyatakan bahwa Ca berfungsi sebagai pemacu motilitas. Pengencer tris kuning telur memiliki komposisi bahan yang lengkap (tris *hydroxymethyl aminomethan*, asam sitrat, fruktosa, antibiotik, lipoprotein, dan lecitin) menyediakan zat makanan dan sumber energi yang penting bagi spermatozoa untuk mempertahankan kehidupannya (Hafez, 2000).

Pengencer AndroMed<sup>®</sup> mengandung protein, karbohidrat (fruktosa, glukosa, manosa, dan maltotriosa), mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor dan mangan), asam sitrat, gliserol, lemak, lecitin, dan *glyseril phosphoryl cloin* (GPC). Fruktosa sebagai substrat energi utama yang terkandung dalam bahan pengencer dasar AndroMed<sup>®</sup> dapat mempertahankan daya hidup spermatozoa selama penyimpanan (Arifiantini dkk, 2005).

#### Daya Hidup (Viabilitas) Spermatozoa Kambing PE Setelah Pembekuan

Pemeriksaan viabilitas spermatozoa menggunakan preparat ulas dengan pewarnaan Eosin Negrosin. Berdasarkan uji Anova (*analysis of variant*) pada Lampiran 10 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0.01$ ) antar pengencer terhadap viabilitas spermatozoa setelah pembekuan. Untuk mengetahui viabilitas yang terendah dan tertinggi maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

Tabel 2 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Viabilitas Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa Setelah Pembekuan :

| Perlakuan | Spermatozoa Hidup (%) ( $\bar{X} \pm SD$ ) |
|-----------|--------------------------------------------|
| P1        | 42,17 <sup>a</sup> $\pm$ 5,81              |
| P2        | 48,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,06             |
| P3        | 58,33 <sup>c</sup> $\pm$ 6,50              |

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ).

Spermatozoa yang telah mati, tidak terdapat perbedaan potensial ion natrium dan kalium antara di dalam dan di luar sel sehingga Eosin Negrosin yang berikatan dengan natrium akan dengan mudah berdifusi ke dalam sel spermatozoa dan menunjukkan penyerapan warna pada kepala saat diberi pewarnaan (Achmadi, 2001). Sejalan dengan pendapat Hardijanto dkk (2008), spermatozoa yang mati permeabilitas membran selnya meningkat, terutama pada daerah *post nuclear caps* sehingga sel spermatozoa yang mati akan menyerap zat warna Eosin Negrosin, sel spermatozoa yang hidup mempunyai kondisi membran yang baik sehingga zat warna kesulitan menembus membran, akibatnya sel spermatozoa tetap berwarna jernih.

Persentase hidup spermatozoa pada Tabel 2 menunjukkan jumlah yang lebih tinggi dibandingkan dengan persentase motilitas pada Tabel 1 Spermatozoa yang hidup belum tentu motil, sedangkan spermatozoa yang motil pasti hidup (Partodiardjo, 1992). Banyaknya spermatozoa yang masih hidup tetapi tidak motil atau tidak bergerak progresif sehingga persentase hidup spermatozoa selalu lebih tinggi daripada persentase motilitas (Kostaman dan Sutana, 2006).

#### Keutuhan (Integritas) Membran Plasma Spermatozoa Kambing PE

Berdasarkan uji Anova (*analysis of variant*) pada Lampiran 11 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata ( $p < 0.01$ ) antar pengencer terhadap integritas membran spermatozoa setelah pembekuan. Untuk mengetahui integritas membran yang tertinggi dan terendah maka dilanjutkan dengan uji Tukey.

Tabel 3 Rerata dan Standar Deviasi Persentase Integritas Membran Spermatozoa Kambing Peranakan Etawa Setelah Diinkubasi:

| Perlakuan | Integritas Membran (%) ( $\bar{X} \pm SD$ ) |
|-----------|---------------------------------------------|
| P1        | 30,67 <sup>a</sup> $\pm$ 5,20               |
| P2        | 33,00 <sup>ab</sup> $\pm$ 5,22              |
| P3        | 41,50 <sup>c</sup> $\pm$ 5,21               |

Superskrip dengan notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0.05$ ).

Metode HOST ini sudah terbukti merupakan suatu metode yang baik untuk mengevaluasi integritas membran spermatozoa hewan domestik (Fonseca *et al*, 2005) seperti kuda, babi, dan sapi (Lodhi *et al*, 2008) hal tersebut dapat dilihat dengan mengamati terjadinya perubahan pada ekor spermatozoa. Fonseca *et al*, (2005) pada spermatozoa yang hidup atau mempunyai membran plasma yang baik maka media HOST yang dipaparkan akan mengaktifkan biokimia aktif yang terdapat pada membran untuk menyeimbangkan cairan di dalam dan di luar sel spermatozoa sehingga larutan hypoosmotik dapat masuk ke dalam spermatozoa, media HOST menyebabkan perluasan sel membran ekor spermatozoa sehingga menggembung dan puncaknya memaksa flagellum untuk menggulung. Susilowati, (2008) mengatakan membran plasma yang utuh ditandai dengan pemutaran ekor, karena membran plasma spermatozoa masih berfungsi baik dalam menyerap air pada lingkungan yang bersifat hipotonik. Sebaliknya spermatozoa dengan membran plasma yang rusak atau permeabilitasnya meningkat, larutan hypoosmotik dapat keluar masuk membran spermatozoa dengan bebas dan tidak terperangkap sehingga ekor terlihat lurus (Mafruchati, 1997).

### Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik kesimpulan bahwa penggunaan pengencer skim kuning telur, tris kuning telur dan Andromed<sup>®</sup> dapat mempertahankan motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa kambing peranakan etawa (PE). Presentase motilitas, viabilitas, dan integritas membran spermatozoa tertinggi diperoleh pada pengencer Andromed<sup>®</sup> yang mengandung lesitin nabati, urutan kedua pengencer tris

kuning telur, dan yang terendah pengencer skim kuning telur.

### Daftar Pustaka

- Achmadi, A. S., 2001. Kaji Banding Kualitas dan Keutuhan Membran Plasma Semen Beku Sapi pada Setiap Tahap Jalur Distribusi. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor.
- Arifiantini, I., T. L. Yusuf, dan Graha N. 2005. Longivitas dan Recovery Rate Pasca Thawing Semen Beku Sapi Friesian Holstein Menggunakan Bahan Pengencer yang Berbeda. Buletin Peternakan. Fakultas Kedokteran Hewan. Bogor. vol. 29 (2)
- Direktorat Jenderal Peternakan. 2007. Petunjuk Teknis Produksi dan Distribusi Semen Beku. Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta.
- Fonseca .j.f, C.A.A. Torres, V.V. Maffilli, A.M. Borges, A.D.F. Santos, M.T. Rodrigues, R.F.M. Oliviera. 2005. Hypoosmotic Swelling Test In Fresh Goat Spermatozoa. Anim. Reprod. 2(2): 139-144
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2000. Reproduction in Farm Animal, 7<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams and Wilkins. South Carolina.
- Hardijanto., T. Sardjito., T. Hernawati., S. Susilowati dan TW. Suprayogi. 2008. Penuntun Praktikum Fisiologi dan Teknologi Reproduksi (IB). Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 8-18.
- Kostaman, T. Dan I.K. Sutana. 2006. Studi Motilitas dan Daya Hidup Spermatozoa Kambing Boer pada Pengencer Tris-Sitrat-Fruktosa. Jurnal Sain Veteriner. Volume 24.
- Kusriningrum, RS. 2009. Buku Ajar Perancangan Percobaan. Cetakan kedua. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penerbit Dani Abadi. Surabaya.
- Lestari, Diena. 2010. Populasi Kambing Ettawa di Indonesia. Bisnis Indonesia. Jakarta.
- Lodhi. L.A, M. Zubais, Z.I. Qureshi, I. Ahmad, H. Jamil. 2008. Correlation Between Hypoosmotic Swelling Test An Various Conventional Semen

- Evaluation Parameters In Fresh Nili-Ravi Buffalo And Sahiwal Cow Bull Semen. *Pakistan vet.j.*, 28(4):186-188
- Mafruchati, M., Luqman, ME., Harjani, N., Widjiati, Poernomo, B. 1997. Pemeriksaan Membran Spermatozoa Pada Semen Beku Domba Setelah Diencerkan. Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. 1-6
- Partodiharjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Edisi Ketiga. Penerbit Mutiara. Jakarta. 530-560.
- Ritar AJ, Ball PD. 1993. The Effect of Freeze-Thawing of Goat and Sheep Semen at a High Density of Spermatozoa on Cell Viability and Fertility After Insemination. *Anim Reprod Sci* 31 : 249-263.
- Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ. 1990. Artificial Insemination of Cashmere Goats: Effects on Fertility and Fecundity of Intravaginal Treatment, Method and Time Insemination, Semen Freezing Process, Number of Motile Spermatozoa and Age Females. *Reprod Fertil Dev* 2: 377-384.
- Rizal M., Herdis, Yulnawati, Hera M. 2008. Peningkatan Kualitas Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang yang Dikriopreservasi dengan Beberapa Konsentrasi. *Jurnal veteriner* : 188-193.
- Salisbury, G.W. and N.L. Van Demark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Diterjemahkan oleh R. Djanuar. Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Sodiq, Akhmad dan Z. Abidin. 2008. Meningkatkan Produksi Susu Kambing Peranakan Etawa. Agromedia Pustaka. Jakarta. 7-15, 82-83.
- Susilowati.S, 2008. Komplek Insulin Like Growth Faktor-I Mempengaruhi Presentase Membran Plasma Utuh Dan Kadar Malondialdehid Spermatozoa. *Jurnal Veteriner*. 9 (4) : 168-179
- Toelihere, M.R., 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Cetakan 3. Penerbit Angkasa. Bandung. 77-89.
- Watson PF. 2000. The Causes of Reduced Fertility with Cryopreserved Semen. *Anini Reprod Sci* 60-61: 481-492.