

MOTILITAS DAN VIABILITAS SPERMATOZOA SEMEN *SEXING* MENGUNAKAN METODE SEDIMENTASI PUTIH TELUR DENGAN PENGECER YANG BERBEDA

Enike Dwi Kusumawati, Aju Tjatur Nugroho Krisnaningsih, YanPiterson Umbu Lele
Universitas Kanjuruhan Malang
enike@unikama.ac.id, enikedwikusumawati@ymail.com

ABSTRAK. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui motilitas dan viabilitas spermatozoa semen hasil *sexing* kambing Peranakan Etawa (PE) dengan metode sedimentasi putih telur menggunakan pengencer yang berbeda. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen segar kambing Peranakan Etawa (PE) berumur 2 tahun dan bobot badan 120 kg dari Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. Metode penelitian ini yang digunakan adalah penelitian laboratorium dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan terdiri dari semen *sexing* dengan menggunakan pengencer Andromed lapisan atas dan Andromed lapisan bawah dan Tris Aminomethan Kuning Telur lapisan atas dan Tris Aminomethan Kuning Telur lapisan bawah dengan masing-masing 10 ulangan. Variabel yang diamati adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa semen *sexing* dengan pengencer yang berbeda, proses *sexing* menggunakan metode sedimentasi putih telur. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA) apabila perlakuan memberikan perbedaan, maka dilanjutkan dengan Uji BNT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kualitas spermatozoa kambing Peranakan Etawa (PE) dengan berbagai macam pengencer menunjukkan pengaruh yang sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap semen. Motilitas dan viabilitas terbaik terdapat pada pengencer Tris aminomethan kuning telur lapisan atas sebesar 75,65%, 74,41% dan Andromed lapisan atas sebesar 65,4%, 60%. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kualitas spermatozoa semen *sexing* kambing PE dengan menggunakan pengencer Tris aminomethan memberikan hasil terbaik terhadap motilitas dan viabilitas.

Kata Kunci: *sexing*; motilitas; viabilitas; pengencer; putih telur

PENDAHULUAN

Kambing Peranakan Etawa (PE) saat ini sangat digemari oleh para peternak di Indonesia. Program IB diharapkan mampu mengoptimalkan penggunaan semen, karena semen dari seekor pejantan dapat digunakan untuk mengawini lebih banyak betina (Rahardian, Wahyuningsih, Ciptadi, 2012). Inseminasi Buatan (IB) dikembangkan untuk dapat menghasilkan keturunan dalam jumlah yang banyak dari seekor pejantan unggul, dan untuk memudahkan pelaksanaan IB maka dikembangkan metode penyimpanan semen (Hafez, 2008). Penentuan jenis kelamin anak sebelum dilahirkan lebih menguntungkan dari segi ekonomis, karena selain dapat menekan biaya pemeliharaan juga dapat menunjang program *breeding* dalam pemilihan bibit unggul.

Sexing memerlukan pengencer yang mampu melindungi dan menyediakan lingkungan yang optimal bagi spermatozoa, agar kualitas spermatozoa hasil *sexing* dapat dipertahankan (Susilawati, Hermanto, Srinto, dan Yuliani, 2002). Andromed mengandung lesitin nabati yang berfungsi melindungi membran plasma spermatozoa (Aires, Hinsch, Schloesser, BognerK, Schloesser, Hinsche, 2003). Berdasarkan hasil penelitian Putra, Susilawati, dan Isnaini (2013) proporsi spermatozoa X dan Y setelah proses *sexing* tertinggi terdapat pada perlakuan inkubasi 20 menit yaitu dengan nilai spermatozoa X sebesar $72,3 \pm 2,06\%$ pada lapisan atas dan spermatozoa Y sebesar $70,9 \pm 4,25\%$ pada lapisan bawah.

Pengencer semen harus memenuhi persyaratan diantaranya mampu mempertahankan pH semen yaitu 6,8-7, mampu mensuplai nutrisi bagi spermatozoa seperti fruktosa dan glukosa sebagai penghasil energi, selain itu juga mampu mempertahankan dari *cold shock* (kejutan dingin) sehingga kualitas spermatozoa mampu dipertahankan. Andromed® merupakan bahan pengencer komersial terdiri dari fosfolipid, tris aminometan, asam sitrat, fruktosa, dan gliserol (Minitub, 2001). Kualitas semen selama penyimpanan sebelum dilakukan IB sangat penting diketahui karena dapat

memperkirakan sejauh mana daya hidup dan fertilitas spermatozoa didalam saluran reproduksi betina (Nurcholidah, Idi, Setiawan, Asmara, Sujana, 2006).

Penghitungan motilitas spermatozoa lebih bersifat subyektif dibandingkan dengan viabilitas. Evaluasi semen dapat dilakukan pada semen segar atau yang telah diencerkan (Ax *et al.*, 2000). Toelihere (2003) mengklasifikasikan gerak individu gerak terbaik, gerak mundur, dan gerak melingkar sering merupakan tanda-tanda *cold shock*, gerakan berayun atau berputar-putar ditempat sering terlihat pada semen yang tua, kemudian apabila spermatozoa banyak yang berhenti bergerak dianggap mati. Eosin dan negrosin adalah pewarna sel yang paling baik dipergunakan untuk prosedur ini sehingga pengamatan sel spermatozoa yang berwarna dan tidak berwarna menjadi jelas (Susilawati, 2000).

Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan bahwa bagaimana motilitas dan viabilitas spermatozoa semen *sexing* kambing Peranakan Etawa menggunakan metode sedimentasi putih telur dengan pengencer Tris aminomethan kuning telur dan Andromed.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui motilitas dan viabilitas spermatozoa semen *sexing* kambing Peranakan Etawa menggunakan metode sedimentasi putih telur dengan pengencer Tris aminomethan kuning telur dan Andromed.

METODE PENELITIAN

Sampel Semen

Jumlah ternak kambing yang dijadikan sampel untuk penelitian adalah 1 ekor ternak kambing jantan dengan kualitas spermatozoa minimal 70% motilitas, 80% viabilitas dan motilitas massa ++, konsentrasi minimal 1500 juta/ml spermatozoa.

Metode Penelitian

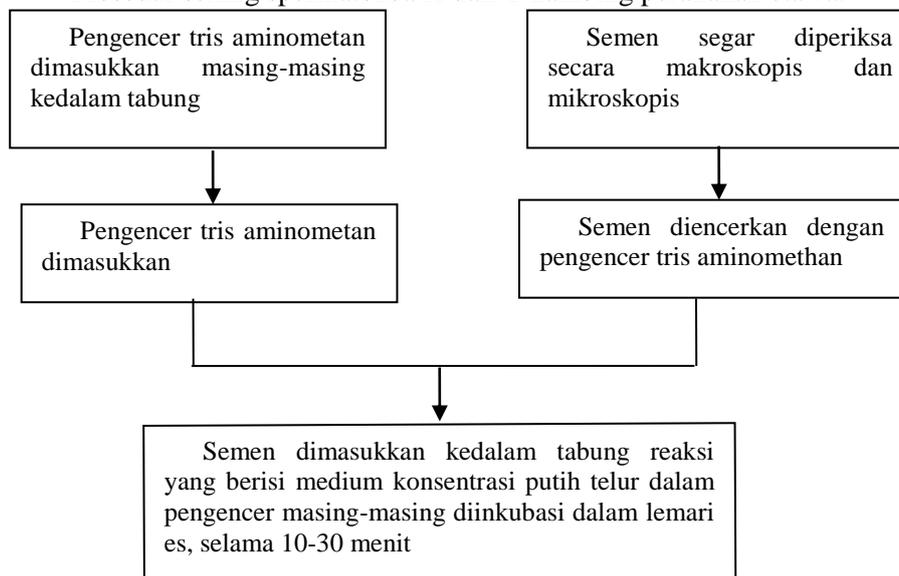
Metode penelitian ini yang digunakan adalah percobaan laboratorium, pola yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan penelitian yaitu *sexing* dengan menggunakan pengencer Andromed lapisan atas dan Andromed lapisan bawah dan Tris Aminomethan Kuning Telur lapisan atas dan Tris Aminomethan Kuning Telur lapisan bawah dengan masing-masing 10 ulangan.

Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi persiapan alat dan bahan, pemeriksaan semen segar, *sexing* spermatozoa X dan Y, pemeriksaan semen setelah *sexing*.

Prosedur *Sexing*

Prosedur *sexing* spermatozoa X dan Y kambing peranakan etawa.



Alat

Mikroskop cahaya, water bath, thermometer, mikropipet, tabung ukur, tabung reaksi, rak tabung reaksi, spuit, kertas label, gunting, object glass, cover glass, tissue.

Bahan

Semen segar kambing PE, pengencer Andromed dan Tris Aminomethan kuning telur, pewarna eosin, negrosin.

Variabel Penelitian

Variabel yang diamati adalah motilitas dan viabilitas spermatozoa semen *sexing* dengan pengencer yang berbeda, proses *sexing* menggunakan metode sedimentasi putih telur. Pengukuran motilitas spermatozoa yaitu :

$$\text{Motilitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa motil progresif}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

$$\text{Viabilitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa hidup}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Analisis data

Motilitas dan viabilitas spermatozoa dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA). Apabila perlakuan memberikan perbedaan, maka dilanjutkan dengan Uji BNT.

HASIL DAN PEMBAHASAN**Kualitas Semen Segar**

Semen yang digunakan dalam proses penelitian ini adalah semen segar kambing Peranakan Etawa (PE) hasil penampungan dari kambing peranakan etawa (PE) dengan umur 3-4 tahun didapatkan di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari, Kabupaten Malang. Pemeriksaan semen yang dilakukan dalam penelitian ini adalah evaluasi secara makroskopis meliputi (volume, warna, pH) dan secara mikroskopis (motilitas dan viabilitas).

Pemeriksaan semen segar kambing Peranakan Etawa dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Evaluasi Semen Segar Kambing PE

Parameter	Rataan
Evaluasi Makroskopis:	
Volume (ml)	1
Konsistensi	Sedang
Warna	Krem
pH	7
Bau	Berbau amis khas sperma
Evaluasi Mikroskopis:	
Motilitas Massa	Sangat bagus (++++)
Motilitas Individu (%)	94,8
Viabilitas (%)	96,35
Abnormalitas (%)	2,9
Konsentrasi (10 ⁶ /ml)	3540,2

Volume semen hasil pada penelitian ini sebesar 1 ml hal ini masih sesuai dengan laporan dari Kartasudjana (2001) yang menyatakan bahwa volume semen kambing setiap kali ejakulasi berkisar antara 0,5-1,5 ml. Sedangkan menurut Hafez dan Hafez (2008), volume semen kambing berkisar antara 0,5-1,2 ml/ ejakulat. Volume semen berbeda menurut bangsa, umur, ukuran badan, frekuensi penampungan, lingkungan, kondisi dari ternak itu sendiri, waktu penampungan dan pakan.

Warna semen yang diperoleh pada penelitian ini adalah krem, hal ini sesuai dengan Evans dan Maxwell (1987) yang mengemukakan bahwa warna semen segar kambing yang normal adalah putih hingga krem. Semen pada penelitian ini dapat dikatakan normal dikarenakan tidak ada campuran warna kemerahan dan warna coklat yang menandakan semen terkontaminasi darah, ataupun warna kehijauan yang merupakan tanda adanya bakteri pembusuk dalam semen. Ini sesuai dengan Kartasudjana (2001) yang menyatakan bahwa bila semen berwarna kemerahan adalah tanda bahwa semen terkontaminasi oleh darah segar, sedang apabila warnanya mendekati coklat dapat merupakan tanda bahwa darah yang mengkontaminasi semen sudah mengalami dekomposisi. Warna kehijauan merupakan tanda adanya bakteri pembusuk dalam semen. Variasi warna semen bisa terjadi antar pejantan dan pada pejantan yang sama dari semen hasil ejakulasi yang berbeda.

Pada penelitian ini konsistensi semen yang diamati adalah sedang. Hal ini menunjukkan bahwa semen yang diteliti pada penelitian ini masih dalam taraf kekentalan yang normal ini dikarenakan kekentalan semen yang diteliti sedikit lebih kental dari susu. Hal ini sesuai dengan pendapat Zenichiro, dkk. (2002) bahwa semen yang baik derajat kekentalannya hampir sama atau sedikit lebih kental dari susu, sedangkan yang jelek baik warna maupun kekentalannya sama dengan air kelapa. Derajat keasaman memegang peranan sangat penting karena dapat mempengaruhi viabilitas spermatozoa. Apabila pH tinggi/rendah akan menyebabkan spermatozoa mati. Derajat keasaman hasil penelitian adalah 7, hal ini masih lebih tinggi menurut Kartasudjana (2001) yang menyebutkan derajat keasaman (pH) semen umumnya pada kisaran 6,4-6,8%. Tetapi pH 7 pada semen yang diteliti termasuk pada kisaran pH netral hal ini masih sesuai dengan Kartasudjana (2001) bahwa derajat keasaman semen pada umumnya pada kisaran pH netral. Bau semen yang dihasilkan pada penelitian ini adalah bau khas sperma yaitu berbau amis khas sperma. Semen yang normal umumnya memiliki bau amis khas disertai bau dari ternak itu sendiri. Bau busuk bisa terjadi apabila semen mengandung nanah yang disebabkan oleh adanya infeksi organ atau saluran reproduksi ternak jantan.

Semakin tinggi skala gerakan atau motilitas massa, maka kualitas sperma semakin baik. Motilitas massa hasil penelitian adalah sangat bagus (+++). Gelombang yang terlihat berbentuk besar-besar dan bergerak sangat cepat dan padat. Tidak tampak sperma secara individual. Hal ini sesuai dengan penilaian Evans dan Maxwell (1987) yang menyatakan bahwa penilaian Sangat bagus mempunyai skor 5 dengan keterangan terlihat sangat padat, gelombang yang terbentuk besar-besar dan bergerak sangat cepat. Tidak tampak sperma secara individual, semen tersebut mengandung 90% atau lebih sperma aktif. Pada penelitian ini rata-rata motilitas individu yang didapat adalah 94,8%, nilai ini lebih tinggi dibandingkan penelitian Kaka (2010) yaitu rata-rata persentase motilitas semen segar kambing adalah 76,67%. Adapun faktor - faktor yang mempengaruhi motilitas sperma menurut Evans dan Maxwell (1987) adalah metode penampungan semen, lingkungan, penanganan dan perawatan semen sesudah penampungan, interval antara penampungan dan evaluasi semen, variasi pejantan serta variasi musim. Faktor-faktor tersebut yang menyebabkan adanya perbedaan hasil motilitas sperma dari setiap pejantan domba dan ternak-ternak pejantan lain.

Persentase viabilitas sperma pada penelitian ini adalah 96,35%, nilai ini lebih besar dibandingkan penelitian Kaka (2010) yaitu sebesar 81,45% pada kambing. Sedangkan penelitian Tambing, dkk (2003) pada kambing adalah 85,79%, nilai ini juga masih rendah bila dibandingkan dengan hasil penelitian ini. Persentase sperma abnormal pada penelitian ini adalah 2,9%, nilai ini sesuai dengan standar Inseminasi Buatan menurut Kartasudjana (2001) yang menyatakan bahwa semen untuk keperluan inseminasi buatan sebaiknya tidak mengandung sperma abnormal lebih dari 20 %. Sedangkan menurut Evans dan Maxwell (1987) bahwa standar persentase abnormalitas spermatozoa kambing yang layak digunakan untuk IB tidak lebih dari 15%. Dengan persentase abnormal 2,9% semen ini dianggap mempunyai kualitas baik karena hal ini sesuai dengan pendapat Arifiantini dan Purwantara (2010) yang menyatakan bahwa pada umumnya bila terlihat sel dengan bentuk abnormal yang primer berjumlah 20% atau lebih maka kualitas semen itu dianggap jelek.

Toelihere (1981), standar minimum bagi kualitas semen yang dapat dipakai untuk inseminasi buatan adalah minimal mengandung 500 juta sel/ml/ejakulat dengan gerakan massa sangat bagus/bagus (+++/+++), serta 50% persentase sperma yang hidup dan motil. Nilai konsentrasi yang diperoleh dari penelitian semen kambing ini adalah 3540,2 juta sel/ml. Nilai konsentrasi ini sesuai dengan Evans dan Maxwell (1987) yang menyatakan bahwa konsentrasi

spermatozoa kambing yang normal berkisar antara 2.500 juta dan 5.000 juta sel/ml. Nilai ini juga sesuai dengan Rasad (2007) tentang pendugaan konsentrasi berdasarkan warna dan kekentalan yang menyatakan semen yang berwarna krem diperkirakan konsentrasi spermatozoa berkisar antara 3500-4500 jutasel/ml. Berdasarkan karakteristik semen segar tersebut diatas, maka dapat dikatakan bahwa semen domba yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kualitas semen yang baik dan memenuhi syarat untuk diproses lebih lanjut sehingga dapat digunakan dalam program IB.

Kualitas Semen Setelah *Sexing*

Kualitas semen setelah *sexing* dapat diukur melalui motilitas dan viabilitas spermatozoa

Motilitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Persentase motilitas spermatozoa setelah *sexing* pada pengencer andromed dan tris aminomethan kuning telur menunjukkan hasil yang sangat nyata seperti pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase Motilitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Perlakuan	Motilitas (%)
Andromed Lapisan Bawah	45±0,52 ^a
Andromed Lapisan Atas	50±0 ^b
Tris Aminomethan kuning telur Lapisan Bawah	60±0 ^c
Tris Aminomethan kuning telur Lapisan Atas	65,4±0 ^d

Keterangan: Notasi yang berbeda (a-d) dalam kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$).

Persentase motilitas spermatozoa setelah *sexing* pada pengencer tris aminomethan kuning telur lapisan atas lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan bawah ataupun Andromed lapisan atas dan bawah dengan nilai berturut-turut sebesar 65,4%, 60%, 50 dan 45%. Hal tersebut disebabkan karena pada pengencer tris aminomethan kuning telur mengandung kuning telur yang mengandung lipoprotein dan fosfolipid yang dapat melindungi integritas membran spermatozoa (Kusumawati, 2015). Menurut Susilawati (2002) bahwa pada lapisan atas lebih banyak mengandung spermatozoa X, sedangkan pada lapisan bawah banyak mengandung spermatozoa Y. Tingginya motilitas spermatozoa pada lapisan atas disebabkan karena spermatozoa X tersebut tidak dapat menembus lapisan putih telur sehingga energinya tidak terkuras. Hal tersebut berbanding terbalik dengan lapisan bawah yang motilitasnya lebih rendah disebabkan spermatozoa Y energinya terkuras untuk melewati 3 lapisan putih telur.

Viabilitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Persentase viabilitas spermatozoa setelah *sexing* pada pengencer andromed dan tris aminomethan kuning telur menunjukkan hasil yang sangat nyata seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase Viabilitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Perlakuan	Viabilitas (%)
Andromed Lapisan Bawah	53.40±0,03 ^a
Andromed Lapisan Atas	60.31±0,14 ^b
Tris Aminomethan kuning telur Lapisan Bawah	74.41±0,19 ^c
Tris Aminomethan kuning telur Lapisan Atas	75.65±0,06 ^d

Keterangan: Notasi yang berbeda (a-d) dalam kolom yang sama menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$).

Persentase viabilitas spermatozoa setelah *sexing* pada pengencer tris aminomethan kuning telur lapisan atas lebih tinggi dibandingkan dengan lapisan bawah ataupun Andromed lapisan atas dan bawah dengan nilai berturut-turut sebesar 75,65%, 74,41%, 60,31 dan 53,40%. Hal tersebut disebabkan karena pada pengencer tris aminomethan kuning telur mengandung kuning telur yang mengandung lipoprotein dan fosfolipid yang dapat melindungi integritas membran spermatozoa

(Kusumawati, 2015), sehingga dapat meminimalkan kematian spermatozoa akibat proses *sexing*. Menurut Susilawati (2002) bahwa pada lapisan atas lebih banyak mengandung spermatozoa X, sedangkan pada lapisan bawah banyak mengandung spermatozoa Y. Tingginya viabilitas spermatozoa pada lapisan atas disebabkan karena spermatozoa X tersebut tidak dapat menembus lapisan putih telur sehingga energinya tidak terkuras yang dapat mengurangi tingkat kematian spermatozoa. Hal tersebut berbanding terbalik dengan lapisan bawah yang viabilitasnya lebih rendah disebabkan spermatozoa Y energinya terkuras untuk melewati 3 lapisan putih telur yang menyebabkan banyak spermatozoa yang viabilitasnya menurun.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari hasil penelitian ini bahwa motilitas dan viabilitas spermatozoa semen *sexing* kambing Peranakan Etawa (PE) menggunakan metode sedimentasi putih telur dengan pengencer Tris Aminomethan kuning telur lapisan atas menunjukkan hasil terbaik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aires, Hinsch, Schloesser, BognerK, Schloesser, HinschE, 2003 . *In Vitro and InVivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybeand Lecihin Based Extenders For Cryopreservation of Bovine Semen*. *Theriogenology* 60(2) : 269-279
- Arifiantini RI, Purwantara B. 2010. Motility and viability of Friesian Holstein spermatozoa in three different extender stored at 5°C. *J Indonesian Trop Anim Agric*. 35(4):222-226.
- Ax, Dally, Didion, Lenz, Love, Hafez, dan Bellin, 2000. Semen Evaluation. P. 365-375. In Hafez, B and E. S. E. Hafez (eds). *Reproduction In Farm Animal*. 7th ed. Lippicott & Wilkins, philadelphia.
- Evans G, Maxwell WMC. 1987. *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. London (UK): Butterworths.
- Hafez, B. 2008. Micromanipulation of Gametes and Embryos: In-Vitro Fertilization and Embryo Transfer (IVF/ET). In *Reproduction In Farm Animals*. 7 ed. (E.S.E. Hafez). Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Hafez, E.S.E. and B. Hafez. 2008. *Reproduction in Farm Animal*, 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. South Carolina.
- Kartasudjana, R. 2001. Teknik Inseminasi Buatan. Jakarta: Departemen pendidikan Nasional.http://mirror.com/...ternak./teknik_inseminasi_pada_ternak.pdf. Diakses pada tanggal 4 Mei 2013.
- Kaka, A, 2010. Evaluasi Semen Kambing Peranakan Etawa. Universitas Nusa Cendana Kupang. <http://blogalexanderkakaspt.blogspot.com/2011/12/evaluasi-semen-kambing-penakan-etawa.html#!/2011/12/evaluasi-semen-kambing-peranakan-etawa.html>. Diakses pada tanggal 10 oktober 2015.
- Kusumawati, 2015. *Sexing Spermatozoa Kambing*. Penerbit Media Nusa Creative.
- Minitub. 2001. Certificate Andromed. Minitub Abfullund Labortechnik GmbH andCo KG. Germany.
- Nurcholidah, Idi, Setiawan, Asmara, Sujana, 2006. Pengaruh Lama Penyimpanan Semen Cair Ayam Buras pada Suhu 50 C terhadap Periode Fertil dan Fertilitas Sperma. *Jurnal ilmu ternak*, juni 2006, vol. 6 no.1, 7 – 11.

- Rahardian, P.P., Wahyuningsih, S., Ciptadi, G. 2012. The Test Quality of Boer Goat Semen Which Frozen With *Mr. Frosty* Instrument by AndroMed® Diluter at the storage temperature of-45°C. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya.
- Rasad S.D. 2007. Inseminasi Buatan. Lab. Reproduksi Ternak Fapet Unpad. <http://blogs.unpad.ac.id/daatje/files/2011/03/bab-II-IB4.pdf>. Diakses pada tanggal 5 januari 2012.
- Susilawati T. 2000. *Sexing* spermatozoa kambing Peranakan Etawa menggunakan gradien putih telur. Widya Agrika. 10 (2) : 97 - 105.
- Susilawati, Hermanto, Srianto, dan Yuliani, 2002. Pemisahan spermatozoa X dan Y pada kambing menggunakan gradien putih telur pada pengencer tris dan tris kuning telur. Jurnal Ilmu-ilmu Hayati 14(2): 176-181.
- Tambing. S. N., Toelihere. M.R., Yusuf. T.L., dan I.K. Utama. 2003. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing Peranakan Etawah. J. Ilmu Ternak dan Vet. 5 (2): 1-8.
- Toelihere. 1981. *Inseminasi Buatan pada Ternak*. Cetakan Keenam. Angkasa. Bandung. pp. 97.
- Toelihere, MR. 2003. Inseminasi Buatan Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Putra, Susilawati, dan Isnaini, 2013. Kualitas dan Proporsi Spermatozoa X dan Y Kambing Etawa Setelah Proses *Sexing* Menggunakan Gradien Densitas Albumin Putih Telur. <http://fapet.ub.ac.id/wp-content/uploads/2013/04/Kualitas-Dan-Proporsi-Spermatozoa-X-Dan-Y-Kambing-Etawa-Setelah-Proses-Sexing-menggunakan-Gradien-Densitas-albumin-Putih-Telur.pdf>. Diakses Tanggal 25 Februari 2014.
- Zenichiro, K., Herliantien dan Sarastina. 2002. Teknologi Processing Semen Beku pada Sapi. Balai Inseminasi Buatan Singosari. Malang.