

THE EFFECT OF DIFFERENT DILUENT TOWARD ABNORMALITY AND MOTILITY SEXING SPERM OF ETAWA CROSS-BRED GOAT (PE) USING EGG WHITE SEDIMENTATION METHOD

Yohanis Pindu Amah, Enike Dwi Kusumawati, Aju Tjatur N. Krisnaningsih,

Fakultas Peternakan Universitas Kanjuruhan Malang
Jl. S. Supriadi No.48 Malang
Email: ajutjatur@unikama.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Kabupaten Malang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui dan mengkaji pengaruh berbagai metode Sedimentasi putih telur terhadap abnormalitas dan motilitas spermatozoa semen *sexing* kambing PE. Metode penelitian ini yang digunakan adalah percobaan laboratorium dengan analisis varian. Hasil penelitian menunjukkan pemeriksaan semen berdasarkan evaluasi mikroskopis yang diperoleh menunjukkan gerak massa yang sangat bagus, cepat dan gelap dengan skor positif 3, motilitas individu 94,8%, konsentrasi 3540,2 juta per ml, viabilitas 96,35%, abnormalitas 2,9%. Motilitas spermatozoa dengan menggunakan pengencer Tris lapisan bawah memiliki nilai terendah dibandingkan pengencer lainnya ($P < 0,01$) sebesar $4,71 \pm 0,09\%$. Dapat disimpulkan bahwa abnormalitas dan motilitas spermatozoa semen *sexing* menggunakan sedimentasi putih telur yang terbaik yaitu dengan pengencer Tris Aminomethan kuning telur dengan rata-rata motilitas sebesar 65,4% dan rata-rata abnormalitas sebesar 4,71%.

Kata kunci: abnormalitas; motility; sperma; sexing;kambing

ABSTRACT

This research was conducted at the Center for Artificial Insemination Singosari district Malang with the purpose of this research is to know and investigate the effect of various methods of white egg sedimentation to abnormalities and motility sexing sperm goat. This research method used a laboratory experiment with analysis was variance. The results showed sperm examination by microscopic evaluation obtained showed a mass movement which was very nice, fast and dark with a positive score of 3, the individual motility was 94.8%, 3540.2 million per ml concentration, viability was 96.35%, abnormalities 2.9 %. Motility was using Tris bottom layer has the lowest value compared to the other diluent ($P < 0.01$) was $4.71 \pm 0.09\%$. It can be concluded that abnormalities and motility *sexing* sperm using egg whites sedimentation are best used with Tris Aminomethan yolks egg with the average motility was 65.4% and the average abnormalities was 4.71%.

Key Words: Abnormalities, Motility, Sexing, Sperm, Goat.

1. Pendahuluan

Kambing peranakan Etawa (PE) saat ini sangat digemari oleh para peternak di Indonesia. Hal ini karena kambing PE merupakan jenis ternak dengan pemeliharaan yang mudah menghasilkan daging dengan susu. 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 (Ditjen Peternakan, 2013). Usaha untuk mempertahankan populasi kambing PE di Indonesia dengan cara inseminasi buatan. Program Inseminasi Buatan (IB) diharapkan mampu mengoptimalkan penggunaan semen, karena semen dari seekor pejantan dapat digunakan untuk mengawini lebih banyak dari betina (Rahardian, Wahyuningsih, Ciptadi, 2012).

Sexing atau pemisahan spermatozoa X dan Y merupakan pilihan tepat untuk mendukung peran inseminasi buatan (IB) dalam rangka meningkatkan efisiensi usaha peternakan. *Sexing* dengan albumin putih telur didasarkan pada perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y dengan membuat medium yang berbeda konsentrasinya (Sianturi, Situ morang, Triwulanningsih, dan Kusumaningrum, 2007).

Menurut Pamungkas, Affandhy, Wijono, Rasyid, dan Susilawati, (2013) hasil *sexing* spermatozoa setelah disimpan pada suhu 5°C selama 6 hari menunjukkan motilitas perlakuanimbangan tingkat pengenceran antara tris aminomethan kuning telur dengan semen yakni (1 : 0,5) ml sebesar 53,75% pada fraksi atas lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan 1:1 (46,25%) dan 1:1,5 (45,0%). Waktu inkubasi 20 menit pada fraksi atas dihasilkan proporsi spermatozoa X sebesar $69,80 \pm 3,94\%$ dengan motilitas $50,50 \pm 5,51\%$. Persentasi hidup $67,92\% \pm 11,17\%$, sedangkan fraksi bawah dihasilkan proporsi spermatozoa Y sebesar $74,00 \pm 9,52\%$ dengan motilitas $43,00 \pm 4,83\%$ dan presentase hidup $72,00 \pm 6,28\%$ (Ningsih, 2007).

Semen adalah cairan yang keluar dari saluran kelamin dari hewan jantan pada saat kopulasi atau penampungan. Semen mengandung sel-sel mikro organisme yang dapat bergerak disebut spermatozoa disebut dan cairan tempat Bergeraknya spermatozoa disebut plasma semen (Garner dan Hafez, 2008). Semen setelah dilakukan penampungan perlu dilakukan pengenceran. Pengencer semen harus memenuhi persyaratan diantaranya mampu mempertahankan pH semen yaitu 6,8-7,0 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. Beberapa bahan pengencer yang digunakan dalam penelitian ini antara lain Tris Aminomethan Kuning telur, Andromed dan CEP-2.

Semen setelah dilakukan penampungan perlu dilakukan pengenceran. 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. Beberapa bahan pengencer yang digunakan salah satunya AndroMed®. Andromed® merupakan bahan pengencer komersial terdiri dari fosfolipid, tris-(hidroksimetil)-aminometan, asam sitrat, fruktosa, gliserol, tilosin tartrat, gentamisin sulfat, spektinomisin, dan linkomisin (Minitub, 2001), Sehingga dalam proses penyimpanan semen tidak mengalami kerusakan.

Pengenceran semen adalah upaya untuk memperbanyak volume semen, mengurangi kepadatan spermatozoa sampai waktu tertentu pada kondisi penyimpanan

dibawah atau di atas titik beku (Rusdin dan Jum'at 2000). Pengeceran dan penyimpanan semen merupakan usaha mempertahankan fertilitas spermatozoa dalam periode yang lebih lama yakni untuk memperpanjang daya hidup spermatozoa, motilitas, dan daya fertilitasnya (Situ Morang, 1992 dalam Rusdin dan Jum'at 2000). Dalam proses pengolahan semen, bahan pengecer adalah bahan yang paling penting untuk mempertahankan kualitas spermatozoa. Tris-kuning telur-glukosa dan susu skim adalah bahan yang umum dipakai untuk *cryopreservasi* semen kambing. Diberbagai literatur disebutkan bahwa kedua pengecer tersebut terbukti mampu mempertahankan kualitas spermatozoa kambing dan pada berbagai hewan domestikasi termasuk kualitas semen beku *post thawing* (Purdy, 2006).

Sexing yang menggunakan bahan albumin yang berasal dari putih telur merupakan metode yang mudah diaplikasikan dan biaya yang dibutuhkan murah. Penggunaan bahan putih telur efektif dalam pemisahan spermatozoa X dan Y. Banyak yang mengungkapkan tentang kegunaan putih telur, dikarenakan putih telur mengandung bermacam-macam protein, enzim inhibitor, anti bakteri, vitamin terikat dan mineral terikat (Susilawati, 2013).

Pengencer yang sering digunakan dalam proses *sexing* saat ini adalah pengencer Andromed dan Tris Aminomethan kuning telur, Andromed dan Tris Aminomethan merupakan pengencer yang digunakan dalam proses penanganan semen beku sampai saat ini. Salah satu pengencer yang sedang dalam tahap pengembangan adalah pengencer Cauda Epididimal Plasma 2 atau disingkat dengan istilah CEP-2 yang memiliki komposisi kimia seperti NaCl, KCl, CaCl₂ (H₂O)₆, NaHCO₃, NaH₂PO₄, KH₂PO₄, Fruktosa, sorbitol, BSA, Tris, Gentamicyn dan asam sitrat, dengan osmolaritas sebesar 340 mOsm dan pH 6,6 (Verberckmoes, Van Soom, Dewulf, de Pauw and de Kruif, 2004).

Ciri-ciri dari kambing PE mempunyai badan besar, dengan tinggi gumba yang jantan 90 cm hingga 127 cm dan yang betina mencapai 92 cm. Bobot kambing jantan bisa mencapai 91 kg, sedangkan betina hanya mencapai 63 kg. Telinganya panjang dan terkulai ke bawah. Dahi dan hidungnya cembung. Baik jantan maupun betina mempunyai tanduk pendek. Kambing jenis ini mampu menghasilkan susu sehingga 3 liter per hari (Andy, 2009).

Semen adalah cairan yang keluar dari saluran kelamin hewan jantan pada saat kopulasi atau penampungan. Semen mengandung sel-sel mikroorganisme yang dapat bergerak disebut spermatozoa dan cairan tempat Bergeraknya spermatozoa disebut plasma semen (Garner dan Hafez, 2008). Volume semen dan konsentrasi spermatozoa per ejakulasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya spesies, umur, musim,

lingkungan, temperatur lingkungan, bangsa ternak, frekuensi penampungan, kondisi pakan dan kesehatan (Jainudeen *et al.*,2008: Memon dan ott, 1981). Volume semen Kambing per ejakulasi berkisar antara 0,1 – 1,5 ml (Jainudeen *et al.*,2008), 1 – 1,08 ml (Tambing *et al.*, 2000).

Saili (2000) melakukan pemisahan dengan menggunakan konsentrasi putih telur secara bertingkat antara 10 % pada lapisan atas serta 30 % dan 50 % pada lapisan bawah. Pada lapisan bawah dengan konsentrasi 30 % dalam pengencer dapat mengisolasi 71,50 % dan pada konsentrasi 50 % dapat mengisolasi 73,50% spermatozoa Y.

Putih telur yang sering disebut albumin merupakan bagian dari telur yang berfungsi sebagai anti bakteri dan *buffer* untuk mempertahankan sifat fisik dan kimia telur. Putih telur terdiri dari tiga lapisan materian yaitu *inner thin albumin* berbentuk cairan agak kental yang terletak pada bagian paling dalam dari putih telur, *thick albumin* merupakan lapisan bagian tengah dan bersifat kental, serta lapisan *outer thin albumin* yang merupakan kantung albumen yang terletak pada bagian paling luar putih telur (Susilawati, 2014).

Albumin yang digunakan dalam penelitian ini adalah albumin pada putih telur. Albumin juga banyak mengandung komponen pokok yang terkandung dalam putih telur adalah sebagai berikut : protein 12,0 %, glukosa 0,4%, lemak 0,3%, garam 0,3% dan air 87,0%. Putih telur terdiri dari bermacam-macam protein, enzim inhibitor, anti bakteri, vitamin yang terikat dan mineral-mineral yang terikat. Protein merupakan bagian terbanyak bahan organik yang menyusun putih telur yang terdiri atas *albumin*, *ovotransferrin*, *ovomucin*, *lysozyme*, *avidin* dan *globulin* sebagai komponen utamanya (Susilawati, 2014; Leonard *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2006; Doosh and Abdul-Rahman, 2014; Sicherer *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2015; Manary *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2013).

Andromed® merupakan suatu medium tanpa kuning telur untuk semen beku dan cair yang mempunyai angka fertilitas tinggi walaupun tanpa kandungan dari hewan aslinya. Selain itu juga tidak mempunyai resiko kontaminasi mikroorganisme serta mudah dalam penanganan dan waktu penyimpanan. Bahan pengencer instan berupa cairan tersusun atas aquabidest, fruktose glyserol, asam sitrat, buffer, phosfolipid, spectynomycine 15 mg, gentamycine 25 mg. Andromed® pengencer alternatif baru, hasilnya lebih baik bila dibandingkan dengan pengencer tris putih telur. Selain itu Andromed® bisa menghasilkan motilitas dan ketahanan spermatozoa yang lebih baik dari pada media tris kuning telur. Andromed® berisi bukan protein hewani seperti protein kuning telur, motilitas progresif post thawing Andromed® juga lebih baik dari tryladyl. Salah satu komposisi Andromed® adalah gliserol. Gliserol merupakan krioprotektan

intaseluler yang memiliki berat molekul 92, 10 kd rumus kimia $C^2H^3(OH)^3$ dan berat jenis 1,25 g/cm³ pada suhu 20°C (Ganer dan Hafez, 2008).

Pengencer yang sering digunakan dalam proses *sexing* saat ini adalah pengencer Andromed dan Tris Aminomethan kuning telur, Andromed dan Tris Aminomethan merupakan pengencer yang digunakan dalam proses penanganan semen beku sampai saat ini. Salah satu pengencer yang sedang dalam tahap pengembangan adalah pengencer Cauda Epididimal Plasma 2 atau disingkat dengan istilah CEP-2 yang memiliki komposisi kimia seperti NaCl, KCl, $CaCl_2(H_2O)_6$, $NaHCO_3$, NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Fruktosa, sorbitol, BSA, Tris, Gentamicyn dan asam sitrat, dengan osmolaritas sebesar 340 mOsm dan pH 6,6 (Verberckmoes, Van Soom, Dewulf, de Pauw and de Kruif, 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengencer yang berbeda terhadap abnormalitas dan motilitas spermatozoa semen *sexing* kambing Peranakan Etawa (PE) dengan metode sedimentasi putih telur.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Balai Besar Inseminasi Buatan Singosari Kabupaten Malang, pada tanggal 1 sampai 30 Juni 2016.

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

Metode penelitian ini yang digunakan adalah Percobaan laboratorium, Pola yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan *sexing* sedimentasi putih telur menggunakan pengencer Andromed Lapisan bawah dan Andromed lapisan Atas, Tris Aminomethan Kuning Telur Lapisan Bawah dan CEP-2. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Prosedur penelitian meliputi pemeriksaan semen segar, *sexing* spermatozoa X dan Y dengan metode sedimensi putih telur menggunakan pengencer Andromed, Tris Aminomethan Kuning Telur dan CEP-2 serta pemeriksaan semen setelah *sexing*.

Variabel yang diamati adalah abnormalitas dan motilitas spermatozoa semen *sexing* kambing etawa (PE) dengan metode *sexing* sedimentasi putih telur.

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

$$\text{Abnormalitas} = \frac{\text{Jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{Jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan Analisis Varian (ANOVA) apabila perlakuan memberikan perbedaan maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

3. Hasil Penelitian

Semen yang digunakan dalam proses penelitian ini adalah semen segar kambing Peranakan Etawa (PE) dengan umur 3-4 tahun yang 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, viabilitas, abnormalitas spermatozoa, dan konsentrasi). Adapun hasil evaluasi semen segar dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil evaluasi semen segar kambing PE

Parameter	Rataan
Evaluasi Makroskopis :	
Volume (ml)	1 ml
Konsistensi	Kental
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

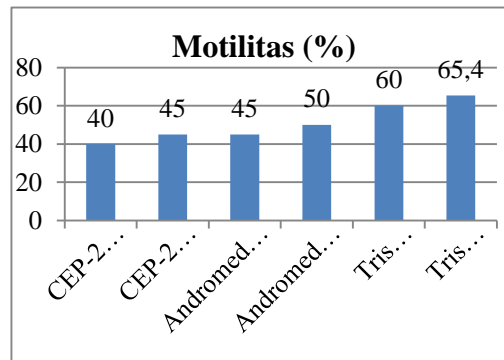
Kualitas semen *sexing* dapat diukur melalui motilitas dan abnormalitas spermatozoa. Hasil pengamatan persentase motilitas spermatozoa didapatkan rata-rata persentase motilitas spermatozoa setelah proses *sexing* menggunakan gradien densitas putih telur dengan pengencer Tris Aminomethan Kuning telur, Andromed dan CEP menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ($P < 0,01$) tertera pada Tabel 2. dan Gambar 1

Tabel 2. Persentase Motilitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Perlakuan	Motilitas (%)
CEP-2 Lapisan bawah	40±0 ^a
CEP-2 Lapisan atas	45±0 ^b
Andromed Lapisan Bawah	45±0 ^b
Andromed Lapisan Atas	50±0 ^c
Tris Lapisan Bawah	60±0 ^d
Tris Lapisan atas	65,4±0,52 ^e

Keterangan: Superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata

($P < 0,01$).



Gambar 1. Motilitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Motilitas spermatozoa dengan menggunakan pengencer CEP-2 lapisan bawah memiliki nilai terendah dibandingkan pengencer yang lainnya ($P < 0,01$) sebesar 40%. Kemudian CEP-2 lapisan atas memiliki nilai motilitas yang tidak berbeda dengan Andromed lapisan bawah ($P > 0,05$). Motilitas spermatozoa dengan pengencer Andromed lapisan atas, Tris lapisan bawah dan Tris lapisan atas berbeda sangat nyata dengan lainnya ($P < 0,01$). Terhadap dengan pengencer lainnya.

Persentase motilitas spermatozoa setelah *sexing* dengan menggunakan pengencer Tris Aminomethan kuning telur lapisan atas lebih tinggi ($P < 0,01$) dibandingkan dengan pengencer lainnya. Hal ini disebabkan karena di dalam Tris Aminomethan kuning telur mengandung kuning telur yang tidak menghambat kemampuan spermatozoa untuk menembus lapisan putih telur (Susilawati, 2014). Selain itu spermatozoa pada lapisan atas energinya tidak terkuras untuk menembus lapisan-lapisan putih telur sehingga motilitasnya tetap tinggi.

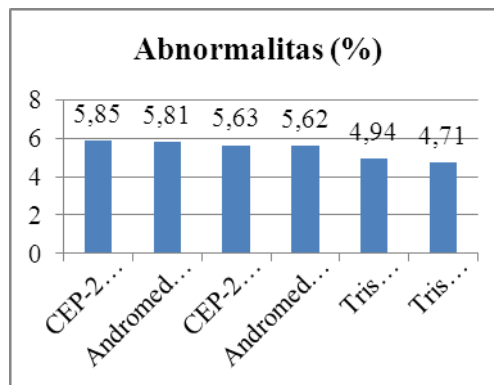
Hasil pengamatan persentase abnormalitas spermatozoa didapatkan rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa setelah proses *sexing* menggunakan gradien

densitas putih telur dengan pengencer Tris Aminomethan Kuning telur, Andromed dan CEP menunjukkan hasil yang berbeda sangat nyata ($P<0,01$) seperti pada Lampiran 2. dan Tabel.

Tabel 3. Persentase Abnormalitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Perlakuan	Abnormalitas (%)
Tris Lapisan atas	4,71±0,09 ^a
Tris Lapisan Bawah	4,94±0,07 ^b
Andromed Lapisan Atas	5,62±0,10 ^b
Andromed Lapisan Bawah	5,81±0,14 ^c
CEP-2 Lapisan Atas	5,63±0,08 ^d
CEP-2 Lapisan Bawah	5,85±0,13 ^e

Keterangan: Superskrip yang berbeda (a-e) menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P<0,01$)

Gambar 2. Abnormalitas Spermatozoa Setelah *Sexing*

Motilitas spermatozoa dengan menggunakan pengencer Tris lapisan bawah memiliki nilai terendah dibandingkan pengencer lainnya ($P<0,01$). Sebesar 4,71±0,09%. Kemudian Tris lapisan atas memiliki nilai motilitas yang tidak berbeda dengan Andromed lapisan atas ($P<0,01$). Motilitas spermatozoa dengan pengencer Andromed Lapisan Bawah, CEP-2 Lapisan Atas dan CEP-2 lapisan Bawah berbeda sangat nyata dengan lainnya ($P<0,01$)

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa abnormalitas dan motilitas spermatozoa semen *sexing* menggunakan sedimentasi putih telur yang terbaik yaitu dengan pengencer Tris Aminomethan kuning telur dengan rata-rata motilitas sebesar 65,4% dan rata-rata abnormalitas sebesar 4,71%.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua pihak terutama Laboratorium lapang Fakultas Peternakan Universitas Kanjuruhan Malang yang telah banyak membantu sejak persiapan hingga terselenggaranya penelitian ini dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

Andy. 2009. *Sekilas Kambing Etawa*. <http://www.kambingetawa.org>, diakses 21

Ditjen Peternakan 2013. *Populasi Kambing diIndonesia 2009-2013*. Badan pusat statistik.

Garner, D.L., and E.S.E. Hafez 2008. *Spermatozoa and Seminal Plasma*. In: *Reproduction in Farm Animal*. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 7th ed. By Hafez, S.E.E, Lea and Febiger. Philadelphia:440-443

Hafez, E.S.E. 2008. *Anatomi of Male in Reproduction Farm Animal*. Ed by ESE Hafez. 7th edition. Blackwell publishing. 3-13.

Hafez, E.S.E., 2008. *X-and Y-C horosome-Bearing Spermatozoa Reproduction in Farm Animal*, ed. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. (pp) : 440-446.

Hafez ESE, 2008. *Reproduction in Farm Animals 7 th Edition*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Jainudden, M.R., H. Wahid and E.S.E. Hafez. 2008. Sheep and Goat. In: *Reproduction in Farm Animal*. Hafez, E.S. E. 7th ed. Lippincott Williams and Wilkins. Awoollers kluwer Company. Philadelphia: 172-181.

Pamungkas, L. Affandhy, D. B. Wijono dan Hartati. 2005. *Aplikasi Inseminasi Semen Hasil sexing pada Sapi induk Peranakan Ongole*. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan Dan Veteriner 2005:1-8

Purdy, P.H 2006. *A Review On Goat Sperm Cryopreservation*. Small ruminant research 63:215-225.

Rahardian ,P.P., Wahyuningsih, S., Ciptadi, G. 2012. *The Test Quality Of Boer Goat Semen Which Frosen Wiht Mr. Frosty Instrumen By Andromed[®] Diluter At The Storage Temperature*. Garner, D.L. , and E.S.E. hafez 2008. Spermatozoa and seminal plasma. In: *Reproduction in farm Animal*. Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 7th ed. Blackwell publishing. 96-109.

Rusdin dan K Jum'at., 2000. *Motilitas Dan Recovery Sperma Domba Dalam Berbagai Pengecer Selama Penyimpanan Pada 5 °C*. Laporan penelitian. Fakultas pertanian Universitas Tadulako, Palu.

Saili, T., M.R. Toelihere, A. Boediono dan B. Tappa 2000. *Keefektipan Albumen Sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y*. Hayati 7,4:106-109.

Susilawati. 2013. *Pendoman Inseminasi Buatan Pada Ternak*. Universitas Brawijaya (UB) press. Malang.

Susilawati. T, Rahayu S, Udrayana S, Sudarwati H and Nugroho E (2014) *Effect of Different Centrifugation on Simental Bull Sprem Quality and Membrane Status after Sexing, Cooling and Freezing Processeng*. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture Special; 8(7): 28-34.

Tambing, S.N., M.R. Toelihere, T.L.Yusuf dan I.K. Utama.2000. *Pengaruh Gliserol Dalam Pengencer Tris Terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawa*. Tesis. Bogor. Program Pasca Sarjana, instut Pertanian Bogor.