

**PERSENTASE MEMBRAN PLASMA UTUH DAN TUDUNG
AKROSOM UTUH SPERMATOZOA KAMBING PERANAKAN
ETAWAH DALAM PENGENCER YANG BERBEDA**

Rona Indra Cahya; Yon Soepri Ondho; Enny Tantini Setiatin

Program Studi S1 Peternakan, Departemen Peternakan

Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro

Jl Drh. R. Soejono Koesoemowardojo – Tembalang Semarang 50275

Email : indracahyarona085@gmail.com

ABSTRAK

Rona, I.C., Yon Soepri Ondho, dan Enny Tantini Setiatin. 2017. persentase membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh spermatozoa kambing peranakan etawah dalam pengencer yang berbeda.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui persentase membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) sel spermatozoa kambing Peranakan Etawah (PE) dalam 2 pengencer yang berbeda pada tahap evaluasi paska ekuilibrisasi dan pasca *freezing*. Dalam penelitian ini digunakan 6 ekor kambing PE jantan umur 5-7 tahun. Semen ditampung dua kali seminggu menggunakan vagina buatan, kemudian diencerkan dengan perlakuan pengencer komersial Andromed[®] dan Bioxcell[®]. Semen diekuilibrisasi pada suhu 4°C selama 4 jam. Semen dikemas di dalam straw mini (0,25 ml), kemudian dibekukan dan disimpan di dalam kontainer nitrogen cair (-196°C). Pengamatan MPU dilakukan melalui *hyposmotik swelling test* (HOS-test), dan TAU diamati dengan mencampurkan semen dengan NaCl fisiologis 0,9% dan formalin 1%. Persentase MPU dan TAU spermatozoa pada tahap paska ekuilibrisasi dalam pengencer Andromed[®] adalah 47,64±3,52% dan 48,10±4,89%, sedangkan dalam pengencer Bioxcell[®] 47,61±4,71% dan 48,93±5,54%. Persentase MPU dan TAU spermatozoa pada tahap *post thawing* dalam pengencer Andromed[®] 42,68±4,23% dan 42,91±6,12%, sedangkan dalam pengencer Bioxcell[®] 43,30±5,35% dan 42,44±5,04%. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan pengencer komersial Andromed[®] dan Bioxcell[®] tidak menunjukkan perbedaan persentase MPU dan TAU secara nyata. Disimpulkan kedua pengencer memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan keutuhan membran plasma dan tudung akrosom sperma kambing Peranakan Etawah selama proses kriopreservasi.

Kata kunci: Membran Plasma Utuh, Tudung Akrosom Utuh, Pengencer, kriopreservasi

ABSTRACT

Rona, I.C., Yon Soepri Ondho, dan Enny Tantini Setiatin. 2017. *percentage of intact plasm membrane and intact acrosome sperm of etawah grade in different extenders.*

The purpose of this research is to identify the percentage of intact plasm membrane (MPU) and intact acrosome (TAU) of Etawah Grade (EG) sperm in 2 different extenders at post equilibration and post freezing evaluation stage. This research used 6 head male goats aged 5-7 years old. Semen was collected twice a week using an artificial vagina, then diluted with commercial extender treatment namely Andromed[®] and Bioxcell[®]. Semen was calibrated at 4°C for 4 hours. It was packed in mini straw (0.25 ml), then it was frozen and stored in liquid nitrogen containers (-196°C). MPU observed by hypoosmotic swelling test (HOS-test), and TAU was observed by mixing semen with NaCl physiological 0,9% and formaline 1%. Percentage MPU and TAU of sperm at post equilibration stage in the Andromed[®]: 47,64 ± 3,52% and 48,10 ± 4,89% respectively, whereas in the Bioxcell[®]: 47,61 ± 4,71% and 48,93 ± 5,54% respectively. Percentage of MPU and TAU sperm at post thawing stage in Andromed[®]: 42,68 ± 4,23% and 42,91 ± 6,12% respectively, whereas in Bioxcell[®]: 43.30 ± 5.35% and 42.44 ± 5,04% respectively. The results showed the use both of commercial extenders did not show significant differences in percentage of MPU and TAU. It was concluded that both of extenders have the same ability in maintaining the integrity of the plasma membrane and acrosome of semen Etawah Grade during the cryopreservation process.

Key words : *Intact Plasm Membran, Intact Acrosome, Extender, Cryopreservation*

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan konsumsi produk hewani skala nasional dan internasional selalu mengalami peningkatan. Ternak kambing yang relatif mudah untuk ditenakkan, menjadi salah satu solusi dalam memenuhi kebutuhan daging nasional. Kambing Peranakan Etawah (PE) merupakan persilangan antara kambing lokal (Kacang) dan Kambing Etawah (Jamnapari) yang memiliki daya reproduksi yang baik, serta sebagai penghasil daging dan susu (Setiawan, 2011). Salah satu upaya yang dilakukan untuk memperbaiki mutu genetik dan memperbanyak jumlah populasi adalah dengan melakukan teknologi inseminasi buatan (IB). IB telah banyak digunakan pada saat ini. Namun tingkat keberhasilan IB pada kambing masih rendah karena beberapa faktor, salah satunya yang telah diidentifikasi adalah rendahnya kualitas pengencer.

Kualitas spermatozoa akan mengalami penurunan saat proses kriopreservasi (pengawetan/ penyimpanan) karena faktor termal (cekaman dingin/ *cold shock*), mekanikal (terbentuknya kristal es intraseluler), kimiawi (komponen pengencer), dan stres osmotik (tekanan osmotik pengencer) (Sutama dkk., 2000). Pengencer memiliki peran yang sangat penting dalam meminimalkan risiko menurunnya kualitas semen saat proses pengolahan maupun paska pengolahan. Pengencer komersial dinilai lebih praktis sebagai bahan pengencer dalam pembuatan semen beku, karena sudah mengandung zat – zat yang dibutuhkan oleh semen untuk bertahan hidup serta memiliki daya simpan yang lebih lama. Pengencer komersial yang telah banyak digunakan di Indonesia adalah Andromed[®]. Andromed[®] merupakan bahan pengencer komersial berbahan dasar tris yang terdiri dari *fosfolipid*, *tris-(hidroksimetil)*, *aminometan*, asam sitrat, *spektinomisin*, dan *linkomisin* (MinitÜb, 2001). Sedangkan pengencer Bioxcell[®] belum banyak digunakan di Indonesia, komposisi Bioxcell[®] ini meliputi karbohidrat, garam mineral, buffer, antioksidan, *phospholipids*, *aquabidest*, gliserol, dan antibiotik (*Gentamycin*, *Tylosin* dan *Spectinomycin*) (imv, 2014).

Dalam proses pengujian kualitas semen beku, parameter Membran Plasma Utuh (MPU) dan Tudung Akrosom Utuh (TAU) menjadi hal yang penting untuk diamati, karena pengujian MPU akan menentukan kemampuan permeabilitas dari membran plasma dalam menjaga fisiologi spermatozoa, sedangkan pengujian TAU dapat menentukan kemampuan

spermatozoa dalam menembus zona pellusida saat proses fertilisasi berlangsung dengan proses reaksi akrosom (Rizal, 2006).

1.2. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui tingkat keutuhan membran plasma dan tudung akrosom sel spermatozoa kambing Peranakan Ettawa (PE) pada 2 pengencer yang berbeda pada tahap ekuilibraasi dan pasca *freezing*.

1.3. Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah dapat memberikan informasi opsi bahan pengencer yang baik untuk pembuatan semen beku kambing Peranakan Etawah (PE) berdasarkan hasil evaluasi membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan pada tanggal 20 Maret hingga 15 Mei 2017 di Balai Inseminasi Buatan, Dinas Peternakan dan Kesehatan Hewan Provinsi Jawa Tengah yang bertempat di Sidumulyo Kabupaten Ungaran, Jawa Tengah. Materi yang digunakan dalam penelitian ini adalah semen hasil dari penampungan Kambing Peranakan Etawah (PE) sebanyak 6 ekor yang berumur 5 – 7 tahun dalam keadaan sehat.

2.1. Rancangan penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian adalah dengan menggunakan analisis T-test dengan ketelitian mencapai $p < 0,05$:

- Rumus uji t

$$Sg = \sqrt{\frac{(n1-1)S1^2 + (n2-1)S2^2}{(n1+n2)- 2}} \dots\dots\dots(1)$$

$$T\text{-test (Asumsi Ragam sama)} = \frac{|\bar{X1} - \bar{X2}|}{Sg \sqrt{\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}}} \dots\dots\dots(2)$$

T tabel dicari pada tabel t dengan (DB) Derajat Bebas = $n_1 + n_2 - 2$ dengan peluang $(1 - \frac{1}{2} \alpha)$

- Keterangan : \bar{X} : Rata – rata sampel
n : Jumlah sampel
S : Ragam atau Varians

2.2. Parameter yang Diukur

Parameter persentase membran plasma utuh (MPU) dan tudung akrosom utuh (TAU) yang diamati mulai dari tahap evaluasi semen segar, paska ekuilibrase dan paska *thawing*.

Membran Plasma Utuh (MPU). Pengamatan MPU dilakukan dengan memaparkan spermatozoa pada larutan *Hypo Osmotic Swelling* (HOS) yang merupakan campuran dari 0,9 g fruktosa, natrium sitrat 0,48 g dan aquabidestilata 100 ml. Semen yang akan diuji dicampur dengan larutan HOS dengan perbandingan 1 : 10 di dalam tabung *ependorf* dan diinkubasi selama 45 menit di suhu 37°C. Dievaluasi dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x, minimum 200 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh ditandai oleh ekor melingkar atau menggelembung, sedangkan yang sudah rusak ditandai dengan ekor lurus. Hasil pengamatan dalam satuan persen (%).

Tudung Akrosom Utuh (TAU). TAU dapat diamati dengan cara mencampurkan semen yang akan diuji dengan larutan *formal saline* (NaCl fisiologis + 1% formalin) dengan perbandingan 1 : 5 ke dalam tabung *ependorf*, dibiarkan beberapa saat dan diteteskan diatas *object glass* lalu ditutup dengan *cover glass*. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop fase kontras menggunakan pembesaran 400x sebanyak minimal 200 spermatozoa. Tudung akrosom utuh ditandai dengan ujung kepala yang berwarna hitam. Hasil dalam satuan persen (%).

2.3. Tahap penelitian

Pelaksanaan penelitian. Meliputi evaluasi semen segar, perlakuan pengenceran, evaluasi semen cair hingga menjadi semen beku dengan uji kualitas Membran Plasma Utuh dan Tudung Akrosom Utuh.

Evaluasi semen segar. Proses ini adalah tahap *Quality Control I*. Pengamatan makroskopis meliputi volume, bau, warna, kekentalan, dan pH. Pengamatan mikroskopis meliputi motilitas (%), hidup mati (%), MPU (%) dan TAU (%). Dilanjutkan dengan pengenceran Andromed[®] (T1) dan Bioxcell[®] (T2). Campuran semen dengan pengencer akan diekuilibrase di dalam *cooling top* bersuhu 4-5°C selama 4 jam. Paska ekuilibrase akan dilakukan *Quality Control II*, meliputi pengujian motilitas, presentase MPU dan TAU.

After Freezing (post thawing), setelah melalui proses pembekuan, 24 jam kemudian akan dilakukan *Quality control III* yaitu pengamatan terhadap parameter Motilitas, MPU dan TAU.

HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Kualitas Semen Segar

Hasil penelitian yang telah dilaksanakan diperoleh data kualitas semen segar kambing PE ($n = 6$ dan ulangan = 8) (Tabel 1). Rata-rata volume lebih tinggi dan pada konsentrasi lebih rendah jika dibandingkan pada penelitian Putranti dkk. (2010) yang menunjukkan rata-rata volume $1,4 \pm 0,42$ ml/ ejakulasi dan konsentrasi $3,29 \pm 0,81$ ($\times 10^9$ sel/ml). Adanya perbedaan volume ejakulat dan konsentrasi semen kambing dipengaruhi oleh perbedaan individu ternak, kondisi lingkungan (musim), kondisi pakan dan frekuensi ejakulat (Sutama dkk., 2000).

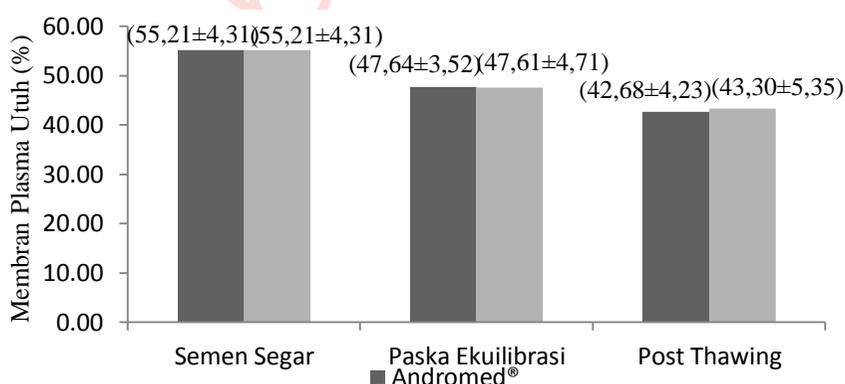
Tabel 1. Hasil Pengamatan Semen Segar Kambing PE

Parameter	Rata – rata
Volume (ml)	$1,73 \pm 0,57$
Warna	Putih/Krem/Kuning
Bau	Spermin
Kekentalan	Sedang – Kental
pH	$6,94 \pm 0,34$
Konsentrasi ($\times 10^9$ /ml)	$1,70 \pm 0,57$
Gerakan massa	++
Motilitas	$50,33 \pm 8,07$
Spermatozoa hidup (%)	$55,88 \pm 6,33$
Membran plasma utuh (%)	$55,21 \pm 4,31$
Tudung akrosom utuh (%)	$56,66 \pm 5,01$

Persentase spermatozoa hidup erat kaitannya dengan gerak massa dan motilitas, ketiga hal ini menentukan kemampuan spermatozoa untuk melakukan perjalanan di saluran reproduksi betina dan melaksanakan pembuahan. Rata-rata motilitas semen kambing PE $50,33 \pm 8,07$ % (Tabel 1). Hasil motilitas ini tergolong normal, menurut Putranti dkk. (2010) motilitas semen segar kambing dalam keadaan normal berkisar antara 50 – 90%. Persentase MPU dan TAU spermatozoa adalah $55,21 \pm 4,31$ % dan $56,66 \pm 5,01$ % (Tabel 1). Hasil ini lebih rendah dibandingkan penelitian Tambing dkk. (2000) yaitu memiliki rata – rata MPU $81,45 \pm 4,45$ dan TAU $78,07 \pm 4,82$ %. Perbedaan persentase MPU spermatozoa antar ternak dapat dipengaruhi oleh perbedaan individu ternak, pola pemeliharaan dan kandungan pengencer (Lubis dkk., 2013). Keutuhan membran plasma dapat mempengaruhi kondisi tudung akrosom. Pengamatan MPU TAU sangat penting karena dapat menentukan kualitas dan kemampuan fertilitas spermatozoa (Sutama dkk., 2000).

3.2. Pengaruh Penambahan Jenis Pengencer yang Berbeda terhadap Persentase Membran Plasma Utuh

Keutuhan membran plasma spermatozoa sangat dibutuhkan untuk proses metabolisme dan proses fertilisasi. Membran plasma spermatozoa memiliki kemampuan permeabilitas yang selektif untuk mengatur aktivitas metabolik intrasel, pH dan komposisi ion (Artika, 2014). Dari hasil rata-rata persentase membran plasma utuh (Ilustrasi 1) menunjukkan bahwa perlakuan kedua pengencer tidak memperlihatkan pengaruh secara nyata. Berdasarkan hasil analisis Uji-T persentase keutuhan membran plasma spermatozoa kambing PE antar pengencer Andromed[®] (T1) dan pengencer Bioxcell[®] (T2) pada tahap paska ekuilibrisasi maupun tahap *post thawing* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Namun jika diamati rata-rata persentase MPU dari tahap ke tahap (Ilustrasi 1), pada tahap semen segar ke tahap paska ekuilibrisasi terlihat kedua pengencer memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan membran plasma utuh spermatozoa kambing PE. Menurut Lubis dkk. (2013) belum ada pengaruh yang nyata terhadap kualitas spermatozoa pada tahap pengenceran ke tahap paska ekuilibrisasi. Pada tahap ekuilibrisasi ke tahap *post thawing* terlihat adanya penurunan yang lebih signifikan pada persentase MPU pada semen yang ditambahkan pengencer Andromed[®]. Pada tahap ini sudah terjadi interaksi antar komponen–komponen bahan pengencer dengan spermatozoa. Diduga kandungan antioksidan pada Bioxcell[®] bekerja dengan baik dalam meminimalkan dampak negatif dari peroksidasi lipid, sehingga keutuhan membran plasma dapat lebih terjaga.



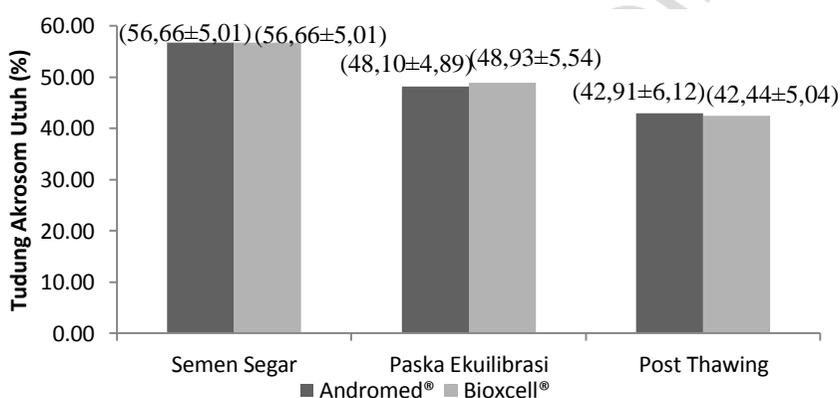
Ilustrasi 1. Rata-rata Persentase Membran Plasma Utuh Spermatozoa Kambing PE dalam Pengencer yang Berbeda

Kerusakan membran plasma spermatozoa dapat terjadi karena perubahan temperatur yang signifikan yang akan merusak lipoprotein yang ada pada membran sperma (Arifiantini dkk., 2005), adanya radikal bebas dari proses metabolisme (Hidayat, 2013) dan dapat pula karena adanya perubahan tekanan osmotik pada plasma semen yang mengakibatkan permeabilitas menurun (Hidayat, 2013). Membran spermatozoa tersusun atas lipid (phospholipid, glikolipid dan kolesterol) dan protein (Isnaini, 2011). Phospholipid dan glikolipid merupakan senyawa asam lemak tak jenuh ganda sehingga mudah berikatan dengan radikal bebas. Pada proses *freezing* (pembekuan) terjadi perubahan suhu yang signifikan yang menyebabkan perubahan polaritas atom-atom atau molekul penyusun membran, hal ini mengakibatkan destabilisasi membran sehingga dapat menurunkan fungsi fisiologis membran. Kerusakan struktur membran akan mengganggu metabolisme sel spermatozoa, metabolisme yang tidak sempurna akan menghasilkan radikal bebas yang sangat reaktif yang mudah berikatan dengan asam lemak tak jenuh yang terkandung di dalam membran spermatozoa yang akan menyebabkan kerusakan membran. Menurut Wahjuningsih dkk. (2012) kerusakan pada membran spermatozoa akan menyebabkan kehilangan motilitas, perubahan metabolisme yang cepat, perubahan morfologi, lepasnya tudung akrosom dan pelepasan komponen intraseluler.

3.3. Pengaruh Penambahan Jenis Pengencer yang Berbeda terhadap Persentase Tudung Akrosom Utuh

Tudung akrosom merupakan bagian terpenting dari spermatozoa karena memiliki peranan dalam keberhasilan fertilisasi saat proses perkawinan (Sutama dkk.,2000). Berdasarkan Ilustrasi 2, menunjukkan penambahan kedua pengencer yang berbeda tidak memperlihatkan pengaruh yang nyata. Hasil analisis uji-T menunjukkan bahwa persentase keutuhan tudung akrosom spermatozoa kambing PE antar pengencer Andromed[®] (T1) dan pengencer Bioxcell[®] (T2) pada tahap paska ekuilibrisasi maupun tahap *post thawing* tidak berpengaruh nyata. Ilustrasi 2 menunjukkan bahwa semen kambing PE yang ditambahkan pengencer Andromed[®] dan Bioxcell[®] hampir berjalan beriringan pada ketiga tahap pengolahan. Menurut Lubis dkk. (2013) selama proses pembekuan, semen akan mengalami penurunan kualitas. Pada tahap semen segar ke tahap ekuilibrisasi, semen yang ditambahkan pengencer Bioxcell[®] terlihat lebih dapat mempertahankan kualitas tudung akrosomnya. Pada tahap

ekuilibrasi menuju ke tahap pembekuan (*freezing*) pada semen kambing PE yang ditambahkan pengencer Andromed[®] terlihat lebih bisa mempertahankan keutuhan tudung akrosom. Diduga kandungan tris, fosfolipid dan gliserol pada Andromed[®] bekerja lebih baik pada tahap pembekuan sehingga dapat mempertahankan keutuhan tudung akrosom lebih baik. Tris sebagai salah satu bahan pengencer dapat memperpanjang daya hidup spermatozoa pada temperatur -5°C dan -196°C , mempertahankan pH, serta dapat mempertahankan osmolaritas (Herdis dkk., 2003).



Ilustrasi 2. Rata-rata Persentase Tudung Akrosom Utuh Semen Kambing PE dalam Pengencer yang Berbeda

Pada bagian selubung akrosom mengandung bahan-bahan akrosomal yaitu enzim-enzim yang memiliki peranan penting dalam menginduksi reaksi akrosom dan interaksi dengan zona pelusida saat proses fertilisasi. Selama proses pembekuan berlangsung, spermatozoa mudah mengalami peroksidasi lipid yang akan merusak sel spermatozoa. Menurut Tambing dkk. (2000) bagian sel spermatozoa yang paling peka terhadap kerusakan peroksidasi endogenous dan eksogenous adalah bagian akrosom. Kondisi membran plasma spermatozoa akan berpengaruh terhadap kondisi tudung akrosom. Hal ini sesuai dengan pendapat Hidayat (2013) bahwa kerusakan membran plasma akan menyebabkan terganggunya metabolisme, motilitas dan kemampuan spermatozoa untuk fertilisasi karena lepasnya komponen seluler dan inaktivasi protein – protein di dalam akrosom. Dengan terpeliharanya tudung akrosom selama proses pembekuan maka diharapkan enzim-enzim tetap ada, sehingga daya fertilitas tinggi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan penggunaan pengencer komersial Andromed[®] dan Bioxcell[®] tidak menunjukkan perbedaan persentase MPU dan TAU secara nyata. Disimpulkan kedua pengencer memiliki kemampuan yang sama dalam mempertahankan keutuhan membran plasma dan tudung akrosom sperma kambing Peranakan Etawah selama proses kriopreservasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Arifiantini, R.I., T.L. Yusuf dan N. Graha. 2005. Longivitas dan *recovery rate pasca thawing* semen beku sapi *Fresian Holstein* menggunakan bahan pengencer yang berbeda. Buletin Peternakan, 29 (2): 53-61.
- Artika, I.N.D. 2014. Penentuan Waktu Optimal Pengujian Integritas Membran Plasma Spermatozoa Babi menggunakan *Hypo-osmotic Swelling* (HOS) Test. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. (SKRIPSI).
- Hidayat, R. 2013. Pengaruh Berbagai Metode Thawing terhadap Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah Berbeda Umur berdasarkan Abnormalitas dan Membran Plasma Utuh Spermatozoa. Fakultas Peternakan dan Pertanian. Universitas Diponegoro. (SKRIPSI)
- Herdis, M.R. Toelihere, I. Supriatna, B. Purwarirata dan RTS. Adikara. 2003. Integritas dan daya hidup spermatozoa pada pembekuan semen domba garut (*Ovis arios*) dengan pengencer dasar tris dan susu skim klining telur. Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia 2(3): 62 – 68.
- Isnaini, N. 2011. Viabilitas spermatozoa kambing boer pasca pendinginan dan pembekuan menggunakan pengencer dasar tris dengan level trehalosa yang berbeda. J. Ternak Tropika. 12 (1), 27 -37.
- Lubis, T.M., C.N.T.Dasrul dan T. Akbar. 2013. Efektifitas penambahan vitamin C dalam pengencer susu skim kuning telur terhadap kualitas spermatozoa kambing boer setelah penyimpanan dingin. Jurnal S.Pertanian 3 (1): 347 – 361.
- Putranti, O.D., Kustono dan Ismaya. 2010. Pengaruh penambahan *crude tannin* pada sperma cair kambing peranakan ettawa yang disimpan selama 14 hari terhadap viabilitas spermatozoa. Buletin Peternakan. 24 (1): 1-7

- Rizal, M. 2006. Fertilitas semen beku hasil ejakulasi dan spermatozoa beku asal cauda epididimis domba garut. Fakultas Pertanian. Universitas Pattimura. *J. Sain Vet.* 34 (1): 49–57.
- Setiawan, B.S. 2011. *Beternak Kambing Domba*. Agromedia Pustaka, Jakarta
- Sutama, I.K., B. Setiadi, P. Situmorang, U. Adiati, I.G.M. Budiarsana, T. Kostaman, Maulana, Mulyawan dan S. Riad. 2000. Uji Kualitas Semen Beku Kambing Peranakan Etawah dan Kambing Boer. Laporan Bagian Proyek Rekayasa Teknologi Peternakan ARMP-II. Balai Penelitian Ternak. Bogor
- Tambing, S.N., M.R.Toelihere, T.L. Yusuf dan I.K. Sutama. 2000. Pengaruh gliserol dalam pengencer tris terhadap kualitas semen beku kambing peranakan etawah. *JITV.* 5 (2): 1-8
- Wahjuningsih, S., Hermanto, Nuryadi, A. Budiarto dan P. Bhintoro. 2012. Effect of sperm concentration and length of storage at 5°C on motility of goat spermatozoa. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 66: 1099 – 11101