

PENGARUH PENCUCIAN SPERMA DENGAN LAMA WAKTU SENTRIFUGASI YANG BERBEDA TERHADAP KUALITAS SPERMA KAMBING BLIGON***EFFECT OF SPERM WASHING WITH DIFFERENT CENTRIFUGATION DURATION ON SPERM QUALITY OF BLIGON BUCK*****Sigit Bintara***

Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No.3, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pencucian sperma dengan *SpermRinse* dengan lama sentrifugasi yang berbeda terhadap kualitas spermatozoa kambing Bligon. Materi yang digunakan dalam penelitian adalah enam ekor kambing Bligon jantan berumur 2 tahun. Sperma dari enam ekor pejantan ditampung dengan menggunakan vagina buatan, kemudian dilakukan penilaian secara mikroskopis yang meliputi konsentrasi, motilitas, persen hidup, dan abnormalitas spermatozoa. Sperma kemudian dicuci dengan larutan *SpermRinse* dan disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm selama 15, 20, dan 25 menit. Data yang diamati adalah motilitas, persen hidup, dan abnormalitas spermatozoa. Data karakteristik sperma segar dihitung dengan *mean* dan standar deviasi, sedangkan data motilitas, persen hidup, dan abnormalitas spermatozoa sebelum dan sesudah pencucian dan sentrifugasi dianalisis menggunakan uji *Duncan's New Multiple Range Test* (DMRT). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pencucian sperma kambing Bligon dengan *SpermRinse* dan sentrifugasi memberikan pengaruh yang sangat nyata ($P \leq 0,01$) terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa. Kesimpulan yang didapat adalah pencucian sperma kambing Bligon dengan *SpermRinse* dapat meningkatkan kualitas sperma. Hasil terbaik diperoleh pada sentrifugasi dengan kecepatan 1.500 ($r = 5,5$ cm) rpm selama 20 menit.

(Kata kunci: Sperma, Kambing Bligon, Pencucian sperma, Kualitas sperma)

ABSTRACT

The objective of the experiment was to examine the effect of sperm washing using SpermRinse with different centrifugation duration (15, 20, and 25 minutes) on the quality of Bligon spermatozoa. Sperm was collected using artificial vagina from six bucks of 2 (two) year olds. Data were collected for motility, viability, and abnormality of the spermatozoa. Characteristics of the fresh sperm were analyzed based on mean and deviation standard, and followed by Duncan's New Multiple Range Test (DMRT). The results showed that washing Bligon buck sperm using SpermRinse with different centrifugation times had very significant effect ($P \leq 0.01$) on the motility, viability, and abnormality of spermatozoa. It is concluded that washing Bligon buck sperm using SpermRinse with centrifugation at 1.500 rpm ($r = 5.5$ cm) could increased sperm quality, of which 20 minutes was the best centrifugation time.

(Key word: Bligon Buck, Sperm, SpermRinse, Sperm quality)

Pendahuluan

Peningkatan produktivitas kambing Bligon dengan cara perkawinan alami masih belum efektif di kalangan peternakan rakyat. Hal ini dikarenakan peternak biasanya hanya memiliki jumlah pejantan yang terbatas untuk mengawini kambing betinanya sehingga menyebabkan rendahnya produktivitas kambing Bligon. Salah satu cara untuk meningkatkan produktivitas ternak, dalam hal ini kambing Bligon adalah dengan teknologi Inseminasi Buatan (IB) yang dapat mempercepat perkembangan populasi dan meningkatkan mutu genetik ternak.

Penggunaan IB menghilangkan kendala biaya produksi serta meningkatkan efisiensi pejantan unggul. Tingkat keberhasilan IB sangat dipengaruhi oleh kualitas sperma. Oleh karena itu perlu diupayakan agar kualitas sperma yang digunakan untuk IB benar-benar baik. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan kualitas sperma adalah dengan cara melakukan pencucian sperma. Dalam upaya peningkatan kualitas sperma, perlu diikuti dengan penilaian kualitas sperma secara akurat. Penilaian kualitas sperma meliputi keadaan umum seperti volume, warna, bau, konsistensi, pH, motilitas atau daya geraknya. Penilaian kualitas sperma sebelum dilakukan pencucian sperma sangat penting karena akan digunakan untuk menentukan kadar pengencer sperma.

*Korespondensi (*corresponding author*):

Telp. +62 812 294 3389, E-mail: sigitbintara@gmail.com

Penilaian motilitas dilakukan dengan mengamati karakteristik gerakan gelombang dari sperma atau pada gerakan progresif sperma (Evans dan Maxwell, 1987). Menurut Bearden dan Fuquay (1997), motilitas sperma progresif merupakan pergerakan maju dari satu titik ke titik lainnya dalam garis lurus. Dalam berbagai ejakulasi tampak beberapa tipe motilitas. Motilitas progresif merupakan uji kualitas paling penting karena fertilitas sangat berhubungan dengan jumlah sperma motil yang diinseminasikan.

Spermatozoa yang digunakan untuk IB sedapat mungkin tidak mengandung spermatozoa yang mempunyai kelainan atau penyimpangan morfologi, sebab pada hakekatnya setiap penyimpangan morfologi dan struktur dari spermatozoa yang normal dikatakan sebagai abnormalitas (Evans dan Maxwell, 1987). Abnormalitas sperma primer termasuk diantaranya kepala tanpa ekor, akrosom abnormal, kepala memanjang runcing, kepala besar, kepala kecil, dan dua kepala. Abnormalitas sekunder termasuk ekor membelit atau melingkar, patah bagian tengah dan utama ekor, ekor terputus dan dua ekor. Bentuk *cytoplasmic droplets* pada leher spermatozoa terjadi selama spermiogenesis (Bearden dan Fuquay, 1997). Abnormalitas spermatozoa ditandai dengan kelainan pada kepala dan ekor apabila diwarnai dengan zat pewarna eosin (Evan dan Maxwell, 1987). Semakin tinggi abnormalitas spermatozoa maka daya fertilitasnya semakin rendah, karena tidak mampu membuahi sel telur. Taming *et al.* (2003) melaporkan bahwa persentase abnormalitas spermatozoa kambing yang digunakan dalam program IB kurang dari 15%. Sperma dari kebanyakan pejantan mengandung beberapa spermatozoa abnormal. Biasanya abnormalitas spermatozoa tidak mempengaruhi fertilitas jika abnormalitas hanya sekitar 20%, meskipun beberapa tipe abnormalitas mempengaruhi fertilitas (Hafez, 2005).

Penghilangan plasma sperma dengan pencucian setelah penampungan meningkatkan persentase hidup dan motilitas spermatozoa (Chemineau *et al.*, 1991). Corteel *et al.* (1984) *cit.* Arthur (2001) menyatakan bahwa jika kuning telur digunakan sebagai pengencer maka pencucian spermatozoa perlu dilakukan yaitu dengan pengenceran oleh larutan *Krebs-Ringer phosphate* dan sentrifugasi. Salah satu bahan yang dapat digunakan untuk pencucian sperma adalah *SpermRinse*. *SpermRinse* merupakan suatu bahan bikarbonat dan media HEPES *buffer* yang mengandung *serum albumin* manusia. Ion organik utama dalam plasma sperma adalah bikarbonat yang diproduksi oleh kelenjar vesikularis dan berfungsi sebagai bahan penyangga, melindungi perubahan pH sperma. Agen anti bakteri dapat mempertahankan fertilitas sperma

dengan cara mengendalikan bakteri di dalam sperma, dan memberikan tambahan energi untuk spermatozoa. *SpermRinse* mengandung *gentamicin* sebagai bahan untuk mensterilkan dan mengawetkan spermatozoa (Anonimus, 2007). *Gentamicin* merupakan agen anti bakteri yang berfungsi mengontrol pertumbuhan bakteri di dalam sperma (Bearden dan Fuquay, 1997). Agen anti bakteri dapat mempertahankan fertilitas sperma dengan cara mengendalikan bakteri di dalam sperma, dan memberikan tambahan energi untuk spermatozoa (Bearden dan Fuquay, 1997).

Pencucian sperma dengan metode sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan spermatozoa dengan plasma sperma, sehingga dapat meningkatkan kualitas sperma terlebih lagi jika ditambahkan dengan pengencer kuning telur. Untuk meningkatkan kualitas sperma kambing maka harus dilakukan penghilangan plasma sperma dengan pencucian sperma segera setelah penampungan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh bahan pencuci *SpermRinse* dan lama sentrifugasi terhadap kualitas spermatozoa kambing Bligon.

Materi dan Metode

Penelitian dilakukan pada bulan September sampai Oktober 2007 di Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan pra penelitian untuk menyesuaikan ternak dengan kondisi pakan dan lingkungan sekitar, melatih pejantan agar terbiasa dengan pengambilan sperma menggunakan vagina buatan. Variabel yang diukur pada penelitian ini adalah motilitas, persentase spermatozoa hidup, dan persentase spermatozoa abnormal.

Materi penelitian adalah 6 ekor kambing Bligon jantan umur dua tahun. Alat utama yang digunakan antara lain vagina buatan, mikroskop merk Zeiss (Jerman) dan alat sentrifus. Bahan yang digunakan antara lain gliserol, glukosa, kuning telur, sodium sitrat, aquades dan *SpermRinse* (Vitrolife, Swedia).

Urutan kerja penelitian meliputi penampungan sperma, evaluasi, atau penilaian sperma, pembuatan pengencer glukosa sitrat kuning telur, pembuatan bahan pencuci sperma, pencucian sperma, dan pengamatan kualitas sperma.

Penampungan sperma

Penampungan sperma menggunakan vagina buatan dilakukan setiap hari pada pagi hari sekitar pukul 07.00 sampai 08.00, dilakukan dua kali per minggu. Penampungan sperma dilakukan dua tahap, yaitu tahap persiapan vagina buatan yang dilakukan

di laboratorium dan tahap penampungan sperma yang dilakukan di kandang.

Penilaian sperma

Motilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa terdiri dari gerakan massa dan individu. Gerakan massa diamati dengan meneteskan spermatozoa di atas gelas obyek dan diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran lemah (obyektif 10x). Gerakan individu diperiksa dengan meneteskan spermatozoa pada gelas obyek yang ditutup gelas penutup di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (obyektif 40x) (Toelihere, 1985).

Persentase spermatozoa hidup dan mati. Persentase spermatozoa hidup dan mati dilakukan dengan meneteskan sperma pada gelas obyek kemudian dicampurkan dengan eosin dan dibuat preparat apus, dipanasi dengan lampu spiritus, selanjutnya diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran kuat (obyektif 40x). Untuk menentukan spermatozoa yang hidup sedikitnya dihitung 100 sampai 200 sel sperma atau yang terbaik 500 sel sperma (Toelihere, 1981).

Abnormalitas spermatozoa. Abnormalitas spermatozoa dihitung dengan melihat spermatozoa pada preparat apus dengan pewarnaan eosin dilihat pada perbesaran 40x. Spermatozoa yang abnormal antara lain spermatozoa dengan kepala tanpa ekor, ekor putus, kepala besar, kepala kecil, kepala memanjang runcing, akrosom abnormal, ekor membelit atau melingkar, patah pada bagian tengah dan utama ekor.

Pembuatan pengencer glukosa sitrat kuning telur

Komposisi bahan pengencer terdiri dari sodium sitrat 2,8 mg, glukosa 2,85 g dengan penambahan aquadestilata sampai 100ml, penicillin sebanyak 100.000 IU/100 ml dan streptomycin sebanyak 0,05 g/100 ml. Bahan sodium sitrat dan glukosa dimasukkan dalam erlenmeyer ditambah aquadestilata sampai 100 ml kemudian dihomogenkan, setelah itu erlenmeyer dimasukkan dalam *beaker glass* yang telah terisi air kemudian dipanaskan sampai air dalam *beaker glass* mendidih. Setelah mendidih, erlenmeyer diangkat dan didiamkan sampai suhu 37°C ditambahkan penicillin dan streptomycin kemudian dihomogenkan, selanjutnya disaring dengan kertas saring. Setelah dingin dimasukkan dalam almari es. Apabila akan digunakan untuk pengencer maka baru ditambahkan 20% kuning telur dari volume pengencer total.

Pembuatan bahan pencuci sperma

Bahan pencuci sperma yang digunakan adalah *SpermRinse* dan bahan pengencer glukosa sitrat kuning telur. Larutan pencuci sperma ada dua

macam yaitu *SpermRinse* 90% dan *SpermRinse* 45%. *SpermRinse* 90% dibuat dengan cara mencampur 4,5 ml *SpermRinse* dengan 0,5 ml sitrat kuning telur. *SpermRinse* 45% dibuat dengan cara mencampur 2,25 ml *SpermRinse* ditambah 2,75 ml sitrat kuning telur.

Pencucian sperma

Pencucian sperma dilakukan dengan menggunakan metode sentrifugasi, 1 ml larutan *SpermRinse* 90% dituangkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 ml larutan *SpermRinse* 45% di atasnya. Diusahakan tidak sampai tercampur, sehingga terbentuk dua lapisan, setelah itu 0,5 ml sperma kambing Bligon dimasukkan ke dalam tabung reaksi melalui dinding tabung. Tabung reaksi yang sudah berisi bahan pencuci dan sperma dimasukkan ke dalam alat sentrifugasi, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm ($r = 5,5$ cm) selama 15, 20, dan 25 menit. Pengambilan hasil sentrifugasi dilakukan dengan menggunakan pipet sebanyak kurang lebih 3 tetes. Satu tetes diletakkan pada preparat apus dengan cara dicampur eosin, satu tetes diletakkan pada preparat untuk diperiksa motilitasnya. Metode pencucian sperma dua lapis (*SpermRinse* 90% dan 45%) sesuai dengan metode yang digunakan oleh Parrish *et al.* (1995) yang menggunakan bahan Percoll dua tingkat yaitu Percoll 90% pada bagian bawah dan 45% di bagian atas.

Analisis data

Data karakteristik sperma segar dihitung nilai *mean* dan standar deviasinya. Data motilitas, persentase hidup dan mati, dan abnormalitas spermatozoa sesudah pencucian antara tiga perlakuan lama sentrifugasi dianalisis dengan *Duncan's New Multiple Range Test*.

Hasil dan Pembahasan

Karakteristik sperma segar

Hasil pengamatan secara mikroskopik karakteristik sperma segar kambing Bligon yang didapat masih baik dan dalam kisaran normal, seperti tersaji pada Tabel 1.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa rerata konsentrasi spermatozoa kambing Bligon dari 12 kali penampungan sebesar $4,38 \pm 0,48^9$ /ml. Menurut Bearden dan Fuquay (1997), konsentrasi spermatozoa kambing berkisar antara 2×10^9 hingga 6×10^9 /ml. Spermatozoa dengan konsentrasi yang tinggi biasanya memiliki reaksi sedikit asam, sedangkan spermatozoa dengan konsentrasi rendah memiliki reaksi sedikit basa. Reaksi basa pada spermatozoa sering kali dikaitkan dengan rendahnya kualitas dan rendahnya fertilitas (Perry, 1969).

Tabel 1. Karakteristik sperma segar kambing Bligon (*characteristics of fresh sperm of Bligon buck*)

Variabel (<i>variable</i>)	rerata ± standar deviasi (<i>mean ± standard deviation</i>)
Konsentrasi sperma (10^9 spermatozoa/ml) (<i>sperm concentration (10^9 sperm/ml)</i>)	4,38±0,48
Motilitas sperma (%) (<i>sperm motility (%)</i>)	74,58±3,96
Spermatozoa hidup (%) (<i>sperm viability (%)</i>)	91,42±1,62
Abnormalitas spermatozoa (%) (<i>sperm abnormality (%)</i>)	4,33±1,07

Tabel 2. Motilitas sperma, persen spermatozoa hidup, dan abnormalitas spermatozoa kambing Bligon sebelum dan sesudah pencucian dengan *SpermRinse* pada lama waktu sentrifugasi yang berbeda (*sperm motility, viability, and abnormality of Bligon buck before and after SpermRinse washing with different centrifugation duration*)

Lama sentrifugasi (menit) (<i>centrifugation duration (minutes)</i>)	Motilitas (%) (<i>motility (%)</i>)	Persen spermatozoa hidup (%) (<i>sperm viability (%)</i>)	Abnormalitas spermatozoa (%) (<i>sperm abnormality (%)</i>)
0	74,58±3,96 ^a	91,42±1,62 ^a	4,33±1,07 ^c
15	78,75±3,11 ^b	93,67±1,07 ^b	2,25±0,75 ^b
20	88,75±2,26 ^c	96,83±1,11 ^c	1,00±0,00 ^a
25	81,61±3,89 ^b	92,25±2,93 ^{ab}	2,42±0,67 ^b

^{a,b,c} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P \leq 0,01$) (*different superscripts at the same column indicate very significant differences ($P \leq 0.01$)*).

Rerata motilitas yang diperoleh adalah 74,58±3,96%, kisaran ini sesuai dengan Hafez (2005); Bearden dan Fuquay (1997) yang memperoleh motilitas spermatozoa domba dan kambing sebesar 60 hingga 80%, sedangkan Evans dan Maxwell (1987) melaporkan motilitas spermatozoa kambing berkisar antara 0 sampai 90%. Persentase spermatozoa hidup yang didapat 91,24±1,62%, sesuai dengan pendapat Perry (1969) yang memperoleh spermatozoa hidup kambing mencapai 90%. Persentase abnormalitas spermatozoa hasil penelitian adalah 4,33±1,07%, lebih baik bila dibandingkan dengan yang dilaporkan oleh Wasiyatun (2000) yaitu sebesar 15,34%, dan Oktaviani (2001) sebesar 8,93%, sedangkan menurut Cupps (1991) abnormalitas spermatozoa kambing dan domba sebesar 10%.

Karakteristik sperma setelah pencucian

Konsentrasi, motilitas, persen hidup, dan abnormalitas spermatozoa pada kambing Bligon setelah pencucian tersaji pada Tabel 2. Motilitas spermatozoa sebelum dan sesudah pencucian dengan waktu sentrifugasi yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($P \leq 0,01$). Peningkatan motilitas terjadi seiring dengan peningkatan lama waktu sentrifugasi dan tertinggi pada waktu 20 menit sentrifugasi. Motilitas spermatozoa antara sentrifugasi selama 15 dan 25 menit tidak berbeda nyata. Peningkatan yang signifikan pada waktu 15 dan 20 menit sentrifugasi dikarenakan spermatozoa yang *immotile* tertinggal di bagian atas tabung dan spermatozoa motil tertinggal di

dasar tabung. Sperma yang akan diproses lebih lanjut adalah sperma yang berada pada dasar tabung yang berisi spermatozoa motil.

Persen hidup spermatozoa menunjukkan perbedaan yang sangat nyata setelah pencucian dengan *SpermRinse* pada beberapa waktu setelah sentrifugasi. Persen hidup meningkat dan mencapai puncak pada 20 menit setelah sentrifugasi yaitu 96,83±1,11%, namun persen hidup pada 15 dan 25 menit setelah sentrifugasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Peningkatan daya hidup spermatozoa setelah pencucian menggunakan *SpermRinse* dengan sentrifugasi dikarenakan spermatozoa yang mati tertinggal di atas tabung dan spermatozoa yang hidup tertinggal di dasar tabung. Selain itu, penggunaan glukosa sitrat kuning telur sebagai pengencer dapat berpengaruh juga terhadap peningkatan daya hidup spermatozoa. Salah satu bahan yang terkandung dalam glukosa sitrat kuning telur adalah sodium sitrat (Bearden dan Fuquay, 1997). Sodium yang terkandung dalam bahan pengencer berfungsi untuk melindungi daya hidup spermatozoa. Bearden dan Fuquay (1997) menyebutkan, sodium dan klorin merupakan ion anorganik utama di dalam plasma seminal spermatozoa. Ion anorganik ini penting untuk melindungi daya hidup spermatozoa, pengaruh ion anorganik dapat menembus membran sel sperma. Kandungan *SpermRinse* salah satunya adalah bikarbonat (Anonimus, 2007). Fungsi bikarbonat adalah membantu daya hidup spermatozoa dengan cara mempertahankan tekanan osmotik plasma seminal sperma. Bersama dengan molekul organik di dalam

cairan plasma seminal, ion anorganik membantu mempertahankan tekanan osmotik hingga mencapai optimum untuk menjaga daya hidup spermatozoa. Ion organik utama yang terkandung di dalam plasma seminal sperma adalah bikarbonat (Bearden dan Fuquay, 1997).

Persentase abnormalitas spermatozoa menunjukkan penurunan seiring lama waktu sentrifugasi, hal ini dikarenakan pencucian sperma mengakibatkan spermatozoa abnormal terpisah dengan spermatozoa morfologi normal, spermatozoa abnormal tertinggal pada bagian atas tabung sedangkan spermatozoa morfologi normal berada pada dasar tabung yang dapat diproses lebih lanjut. Semakin tinggi abnormalitas spermatozoa maka daya fertilitasnya semakin rendah, karena tidak mampu membuahi sel telur (Tambing *et al.*, 2001). Abnormalitas pada 15 menit setelah sentrifugasi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan 25 menit setelah sentrifugasi yaitu sebesar $2,25 \pm 0,75$ dan $2,42 \pm 0,67\%$. Tiap ejakulat biasanya mengandung beberapa bentuk spermatozoa abnormal (Cupps, 1991). Abnormalitas spermatozoa tidak berpengaruh pada fertilitas hingga proporsi abnormalitas mencapai 20%, meskipun ada beberapa tipe abnormalitas yang dihubungkan dengan infertilitas. Perhatian khusus mengenai spermatozoa abnormal tertuju pada bentuk akrosom karena akrosom memainkan peranan penting dalam fertilisasi (Hafez, 2005). Perlakuan yang baik terhadap sperma sewaktu dan sesudah ejakulasi dan sewaktu pewarnaan dan pembuatan preparat ulas, dapat mengurangi kerusakan spermatozoa (Toeliehere, 1985).

Kesimpulan

Pencucian sperma kambing Bligon menggunakan *SpermRinse* dengan waktu sentrifugasi selama 15, 20, dan 25 menit dapat meningkatkan kualitas spermatozoa. Kualitas spermatozoa terbaik diperoleh setelah pencucian *SpermRinse* pada sentrifugasi dengan kecepatan 1.500 rpm ($r = 5,5$ cm) selama 20 menit.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami haturkan kepada yth. Pratiwi Wulandari, S.Pt, dan Ir. Kustono, M.Sc. Ph.D. yang telah berkontribusi dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Anonimus. 2007. *SpermRinse*. Available at <http://www.vitrolife.com/>. Accession date: June 21, 2007.
- Arthur, H. 2001. Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. Saunders. Toronto. pp. 754-755, 768.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1997. Applied Animal Reproduction, 4th ed. Prentice Hall. New York.
- Chemineau, P., Y. Cagnie, P. Orgeaur, and J.C. Vallet. 1991. Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Rome.
- Cupps, P.T. 1991. Reproduction in Domestic Animals, 4th ed. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Javanovich, Publishers. San Diego, New York, Boston.
- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths Pty Limited. Collingwood. Victoria.
- Hafez, E.S.E. 2005. Reproduction in Farm Animal, 6th ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Oktaviani, D. 2001. Pengaruh aras kuning telur dan aras gliserol terhadap motilitas, viabilitas, dan abnormalitas spermatozoa kambing Bligon sebelum dan sesudah pembekuan. Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Parrish, J.J., A. Krogrnaes, and J.L. Susko-Parrish. 1995. Effect of bovine serum separation by either swim-up or percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. Theriogenology 44:859-869.
- Perry, E.J. 1969. The Artificial Insemination of Farm Animals. Oxford & IBH Publishing Co. Calcuta, Bombay, New Delhi.
- Tambing, S.N., M. Ghazali, dan P. Bambang. 2001. Pemberdayaan teknologi inseminasi buatan pada ternak kambing. Wartazoa 2(1):1-9.
- Tambing, S.N., M.R. Toeliehere, T.L. Yusuf, dan I.K. Utama. 2003. Pengaruh frekuensi ejakulasi terhadap karakteristik semen segar dan kemampuan libido Kambing Saanen. Balai Penelitian Ternak. Bogor.
- Toeliehere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Toeliehere, M.R. 1985. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Wasiyatun. 2000. Pengaruh pemberian hormon testosteron dan oksitosin terhadap kuantitas dan kualitas ejakulat kambing Bligon. Skripsi. Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.