

4

**DAYA TAHAN SEMEN CAIR KAMBING PERANAKAN ETAWAH DALAM
PENGECER KUNING TELUR DENGAN KEMASAN DAN
KONSENTRASI SPERMATOZOA YANG BERBEDA**
(*Sperm Viability of Ettawah Crossbred Liquid Semen Diluted in Egg Yolk Extender
on Different Packing and Concentration*)

T.L. Yusuf, R.I. Arifiantini, dan N. Rahmiwati
Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui daya tahan spermatozoa dalam bahan pengencer kuning telur dalam konsentrasi yang berbeda menggunakan kemasan *pool* dan *straw*. Semen ditampung satu kali dalam seminggu dari empat ekor pejantan kambing peranakan etawah yang berumur 2-3 tahun. Semen setelah diperiksa secara makroskopik dan mikroskopik, lalu diencerkan dengan konsentrasi 100×10^6 spermatozoa $\text{ml}^{-0.3}$ dan 50×10^6 spermatozoa $\text{ml}^{-0.3}$, kemudian masing-masing disimpan dalam kemasan *pool*, *straw water jacket* dan *straw bebas*. Semua kemasan disimpan di lemari es pada suhu $4-5^\circ\text{C}$ dan diamati setiap 12 jam.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa daya tahan spermatozoa ternyata lebih baik dalam konsentrasi 50×10^6 spermatozoa $\text{ml}^{-0.3}$ (45,70%) dibandingkan konsentrasi 100×10^6 spermatozoa $\text{ml}^{-0.3}$ (35,97%) selama penyimpanan 96 jam. Kemasan *straw water jacket* bertahan lebih baik sampai 108 jam (41,25%) dibandingkan *pool* (38,33%) dan *straw bebas* (25,42%). Dari hasil diatas terdapat pengaruh nyata ($P < 0,05$) antara kemasan dan konsentrasi terhadap persentase spermatozoa motil.

Kata kunci : straw, semen cair, spermatozoa, kambing

ABSTRACT

The aim of the research was to study the sperm viability in egg yolk extender on different concentrations using pool and straws system. The semen were collected once a week from four Ettawah crossbred bucks with age of 2-3 year. After macroscopic and microscopic examination, the semen were divided into two different concentration (100×10^6 spermatozoa $\text{ml}^{-0.3}$ and 50×10^6 spermatozoa $\text{ml}^{-0.3}$) and diluted with the egg yolk extender, followed by storage in free straw, pool and straw water jacket, respectively. The diluted semen then were packed in the pool and straws system and stored in the refrigerator $4-5^\circ\text{C}$. The straws were put in backer glass with water jacket and without water (free) and were observed every 12 hours.

The results of this research showed that sperm viability in 50×10^6 $\text{ml}^{-0.3}$ (45.70%) was significantly higher than sperm viability in 100×10^6 $\text{ml}^{-0.3}$ (35.97%) after 96 hours of storage. Up to 108 hours the straw water jacket had better viability (41.25%) compared to pool (38.33%) and free straw (25.42%). There was a significant correlation ($P < 0.05$) between storage system and concentration to sperm viability.

Keywords : straws, liquid semen, sperm, goat

PENDAHULUAN

Pengawetan (preservasi) semen dapat dilakukan dengan semen cair yang disimpan pada temperatur 5°C. Selama ini penyimpanan semen cair dilakukan dalam suatu tabung dalam jumlah beberapa dosis inseminasi yang disebut sistem pool. Pada saat akan digunakan harus dihomogenkan dan diambil sesuai volume dan jumlah sel yang diinginkan. Beberapa kelemahan sistem ini adalah : pada saat dilakukan homogenisasi jika dilakukan dengan ceroboh akan mempengaruhi kualitas semen, disamping itu jumlah sel yang diharapkan untuk sekali dosis IB bisa tidak tepat. Selain itu dengan sistem pool pada saat dilakukan transportasi maka pengaruh guncangan diperjalanan juga akan mempengaruhi kualitas, disamping terjadinya resiko tumpah lebih besar. Penggunaan straw untuk semen cair telah dilakukan di beberapa tempat. Keuntungan kemasan straw adalah ketepatan dosis inseminasi yang diharapkan, mengurangi resiko terjadinya tumpah sehingga mudah dalam distribusinya.

Dosis inseminasi pada kambing dan domba adalah 50-60 juta ml^{-0.2} (Sorenson, 1979). Mengingat tingkat kesulitan tinggi dalam menembus cincin serviks pada ternak kambing dan domba maka banyak peneliti menyarankan untuk meningkatkan dosis inseminasi semen cair sampai 50-150 juta (Toelihere, 1993) atau 200 juta dengan volume inseminasi 0,05-0,2 (Evan dan Maxwell, 1987) atau 0,2 -0,5 ml (Bearden dan Fuquay, 1997). Tingginya jumlah spermatozoa dalam volume yang kecil tadi akan menyebabkan terjadinya persaingan dalam

memanfaatkan nutrisi yang tersedia dalam pengencer semen. Selain faktor nutrisi, kemungkinan akumulasi asam laktat dari sisa metabolisme semakin tinggi yang akibatnya akan menurunkan pH lingkungan dan menyebabkan kerusakan pada spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi daya tahan spermatozoa dalam kemasan pool dan straw pada pengencer tris-kuning telur dengan berbagai posisi penyimpanan dengan jumlah sel spermatozoa yang berbeda.

MATERI DAN METODE

Semen diperoleh dari empat ekor kambing PE jantan dewasa berumur 2-3 tahun, dengan bobot badan 42-47 kg dengan kondisi kesehatan reproduksi yang normal. Keempat pejantan tersebut dikandangkan secara individual dalam kandang panggung yang terbuat dari kayu. Pakan yang diberikan berupa rumput segar dan konsentrat masing-masing 10% dan 1% dari berat badan. Air minum diberikan *ad libitum*.

Penampungan semen dilakukan satu minggu sekali menggunakan vagina buatan, sebanyak dua ejakulat (di pool menjadi satu) untuk masing-masing jantan. Penampungan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan (12 ejakulat) Semen yang didapat dievaluasi kualitasnya secara makroskopis meliputi volume (menggunakan pipet ukur) pH (menggunakan *pH special indicator pape*; Merck, skala 6,5-10) dan konsistensi (dengan kriteria encer, sedang dan kental), serta warna semen.

Pemeriksaan mikroskopis meliputi gerakan

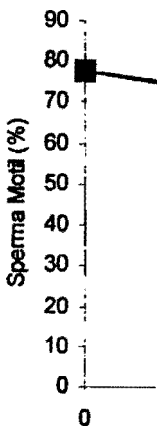
Tabel 1. Komposisi Pengencer Tris Kuning Telur

Bahan / Komposisi	Kadar
Tris (hidroxymethyl aminomethan)(g) ¹⁾	2,98
Asam Sitrat (g) ¹⁾	1,65
Fruktosa (g) ¹⁾	2
Kuning Telur (ml) ²⁾	20
Penicillin (IU) ³⁾	100.000
Streptomycin (mg) ³⁾	100
Aquabidest (ml) <i>ad</i>	100

¹⁾Merck; ²⁾telur ayam ras; ³⁾ Meiji
Sumber : Tambing (1999)

Kar
Volume (ml)
Warna
Bau
Konsistensi
pH
Gerakan massa
Sperma motil (%)
Konsentrasi sperma
Sperma Hidup (%)
Sperma Abnormal (%)

massa, dengan skor sperma motil dievaluasi sebanyak 10 lapang spermatozoa motil yang lapang pandang, pen tidak ada yang berg bergerak progresif penilaian 5% (Soren hidup dan sperma ab differensial dengan p and Oko, 1989).
Pengenceran dan pe



ng tersedia dalam pengencer
 risi, kemungkinan akumulasi
 bolisme semakin tinggi yang
 unkan pH lingkungan dan
 kan pada spermatozoa
 untuk mengevaluasi daya
 m kemasan pool dan straw
 ning telur dengan berbagai
 gan jumlah sel spermatozoa

AN METODE

dari empat ekor kambing PE
 2-3 tahun, dengan bobot
 kondisi kesehatan reproduksi
 pat pejantan tersebut
 individual dalam kandang
 t dari kayu. Pakan yang
 out segar dan konsentrat
 1% dari berat badan. Air
 m.
 en dilakukan satu minggu
 ina buatan, sebanyak dua
 satu) untuk masing-masing
 ilakukan sebanyak 3 kali
 en yang didapat dievaluasi
 skopis meliputi volume (
) pH (menggunakan pH
 Merck, skala 6,5-10) dan
 teria encer, sedang dan
 .
 skopis meliputi gerakan

ar
 8
 5
 00
)
)

Tabel 2. Karakteristik Semen Segar Kambing Peranakan Etawah

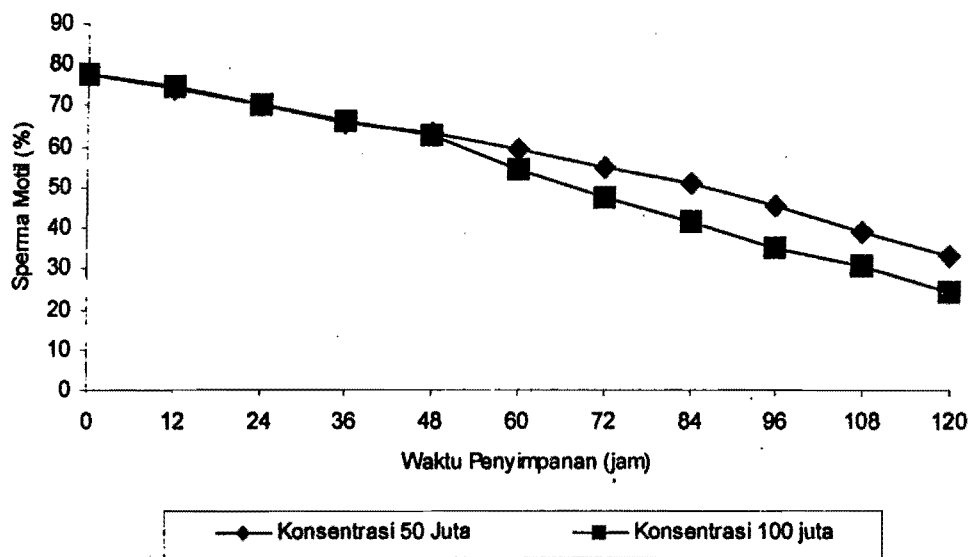
Karakteristik semen	Nilai rata-rata
Volume (ml)	1,42 ± 0,33
Warna	krem
Bau	khas
Konsistensi	kental
pH	7
Gerakan massa	3
Sperma motil (%)	77,50 ± 1,35
Konsentrasi sperma (juta sel/ml)	2806,3 ± 953,0
Sperma Hidup (%)	83,95 ± 2,70
Sperma Abnormal (%)	4,59 ± 1,46

massa, dengan skor positif 1,2 dan 3. Persentase sperma motil dievaluasi secara subjektif kuantitatif sebanyak 10 lapang pandang dengan jumlah spermatozoa motil yang diamati 10-20 sel untuk setiap lapang pandang, penilaian dilakukan mulai dari 0% tidak ada yang bergerak progresif sampai 100% bergerak progresif seluruhnya dengan kisaran penilaian 5% (Sorenson, 1979). Persentase sperma hidup dan sperma abnormal menggunakan preparat differensial dengan pewarnaan eosin nigrosin (Barth and Oko, 1989).

Pengenceran dan pengemasan

Semen yang memiliki presentase sperma motil >70% dengan konsentrasi spermatozoa > 2000 juta/ml dan spermatozoa abnormal < 15% (Hafez and Hafez, 2000) dibagi dua dan diencerkan menggunakan bahan pengencer tris kuning telur (Tabel 1) dengan dosis inseminasi 50 dan 100 juta per 0,3 ml. Semen yang telah diencerkan dikemas dalam bentuk *pool*, *straw water jacket* dan straw bebas. Pengamatan persentase spermatozoa motil dilakukan setiap 12 jam selama 120 jam (lima hari).

Peubah yang diamati adalah persentase spermatozoa motil progresif di nilai secara subyektif



Ilustrasi 1. Pengaruh Konsentrasi Spermatozoa Terhadap Spermatozoa Motil (%)

kuantitatif dari lima lapang pandang yang berbeda. Data yang diperoleh dianalisis dengan rancangan acak lengkap (RAL) dengan dua faktor yaitu konsentrasi dosis IB dan sistem penyimpanan. Jika ada perbedaan pada analisa ragam (ANOVA) dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torie, 1993)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Semen Segar

Dari hasil pemeriksaan semen segar yang didapatkan pada penelitian ini menunjukkan bahwa semen tersebut mempunyai kualitas yang baik dan memenuhi persyaratan untuk diencerkan (Tabel 2). Volume 1,42 ml; pH 7; warna krem dan konsistensi kental. Evaluasi mikroskopis menunjukkan gelombang masa yang cepat dan gelap dengan skor positif 3, spermatozoa motil 77,50% dengan konsentrasi 2806,3 juta per ml. Spermatozoa hidup 83,95% dengan spermatozoa abnormal hanya 4,59%. Kualitas spermatozoa termasuk baik menurut Hafez and Hafez (2000); Bearden and Fuguay (1997).

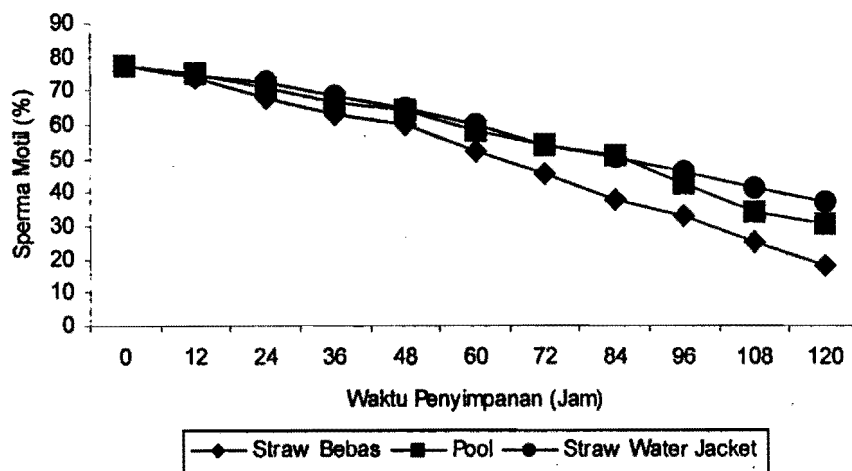
Kualitas Semen Cair

Pengaruh Konsentrasi Spermatozoa terhadap Daya Tahan Spermatozoa. Konsentrasi spermatozoa dalam satu dosis IB berpengaruh terhadap daya tahan, terutama apabila semen cair akan disimpan pada waktu tertentu didalam lemari es. Hasil penelitian menunjukkan penyimpanan spermatozoa dalam

bahan pengencer tris kuning telur pada kedua konsentrasi spermatozoa selama 48 jam penyimpanan relatif lebih stabil. Perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) mulai terjadi pada saat penyimpanan = 60 jam, dimana terjadi penurunan persentase spermatozoa motil pada konsentrasi $100 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ sebesar 8,47%; nilai ini nyata lebih tinggi jika dibandingkan dengan konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ yaitu sebesar 4,03%. Pada penyimpanan 96 jam konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ ternyata mampu mempertahankan sperma motil sebesar 45,70% lebih baik dibandingkan konsentrasi $100 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ yaitu sebesar 35,97% dengan penurunan masing-masing sebesar 31,8% dan 41,53% (Ilustrasi 1).

Hasil penelitian ini sesuai dengan laporan Arifiantini (1998) mempunyai spermatozoa motil 49,06% lebih baik dibandingkan konsentrasi $100 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.2}$ (42,5%) dan $150 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.2}$ (28,75%) pada jani yang sama, hal tersebut disebabkan karena bahan pengencer tris kuning telur merupakan suatu bahan pengencer yang memiliki sifat buffer, sehingga dapat mengatur keseimbangan pH semen.

Disamping itu dengan konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ dapat mengurangi penurunan spermatozoa motil selama penyimpanan, karena kandungan larutan pengencer yang lebih banyak mengurangi kompetisi kebutuhan energi sehingga menjamin kebutuhan nutrisi spermatozoa (Toelihere, 1993). Pengaruh konsentrasi terhadap motilitas spermatozoa telah dilakukan oleh Arifiantini (1998) pada semen cair



Ilustrasi 2. Pengaruh Berbagai Tempat Penyimpanan terhadap Persentase Spermatozoa Motil

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0

Sperma Motil (%)

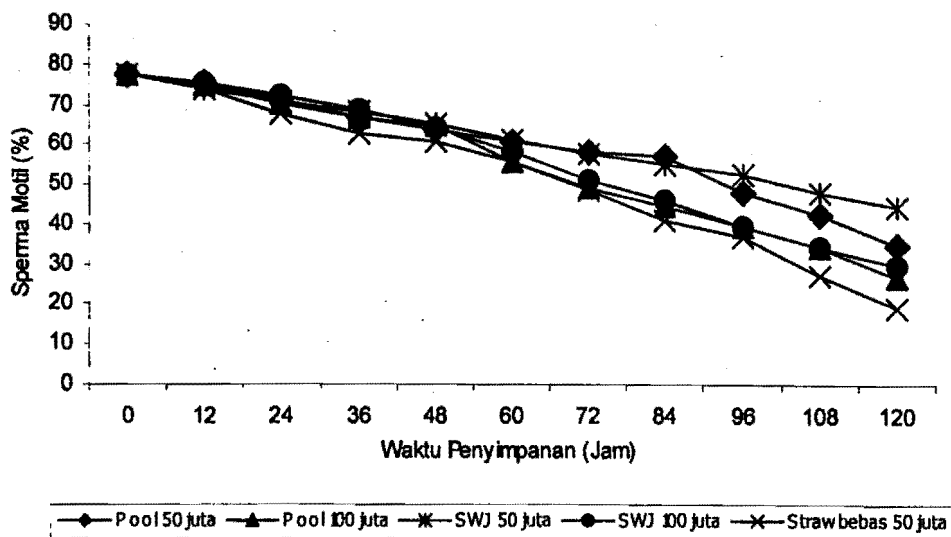
domba garut, hasil jumlah dosis II penurunan sperma Hal ini dapat dipa pada satu satuan v kompetisi penggu sisa metabolisme o akhir metabolisme yang berlebihan. (Tambing, 1999).

Pengaruh terhadap Persent tahan spermatozo dapat dinilai deng mempertahankan disimpan dalam be penelitian menun selama 12 jam se Setelah peny spermatozoa moti Kemasan straw b motil yang lebih r dibandingkan de straw water jacke persentase sperm setelah penyimpa sperma yang moti bebas (7-8%) di

elur pada kedua jam penyimpanan g nyata ($P < 0,05$) = 60 jam, dimana atozoa motil pada 7%; nilai ini nyata ngan konsentrasi ada penyimpanan ternyata mampu esar 45,70% lebih $100 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ yaitu n masing-masing i 1).

dengan laporan ermatozoa motil nsentrasi 100×10^6 (8,75%) pada jam an karena bahan akan suatu bahan er, sehingga dapat

entasi $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ ermatozoa motil ndungan larutan urangi kompetisi amin kebutuhan (1993). Pengaruh ermatozoa telah pada semen cair



Ilustrasi 3. Interaksi konsentrasi dan Kemasan terhadap Motilitas Spermatozoa

domba garut, hasilnya menunjukkan bahwa perbedaan jumlah dosis IB akan berpengaruh terhadap penurunan spermatozoa motil selama penyimpanan. Hal ini dapat dipahami, dengan sedikitnya jumlah sel pada satu satuan volume tertentu akan menyebabkan kompetisi penggunaan nutrisi dapat diperkecil dan sisa metabolisme dapat diminimalkan mengingat hasil akhir metabolisme berupa penimbunan asam laktat yang berlebihan, dapat membunuh spermatozoa (Tambing, 1999).

Pengaruh Berbagai kemasan Penyimpanan terhadap Persentase Motilitas Spermatozoa. Daya tahan spermatozoa dalam pengencer Tris kuning telur dapat dinilai dengan melihat kemampuannya dalam mempertahankan persentase spermatozoa motil yang disimpan dalam berbagai metode penyimpanan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam penyimpanan selama 12 jam seluruh kemasan relatif masih stabil. Setelah penyimpanan 24 jam, persentase spermatozoa motil mulai menunjukkan perbedaan. Kemasan straw bebas memiliki persentase sperma motil yang lebih rendah ($P < 0,05$) yaitu sebesar 67,92% dibandingkan dengan kemasan *pool* (70,83%) dan *straw water jacket* (71,67%) (Ilustrasi 2). Perbedaan persentase spermatozoa motil lebih nyata ($P < 0,05$) setelah penyimpanan 48 jam. Penurunan persentase sperma yang motil lebih tinggi pada kemasan straw bebas (7-8%) dibandingkan kemasan *straw water*

jacket dan *pool* yang penurunannya relatif lebih stabil hanya 4-5% setiap 12 jam. Spermatozoa dalam ketiga kemasan layak untuk digunakan sampai 72 jam penyimpanan, karena masing-masing kemasan menunjukkan nilai motilitas spermatozoa rata-rata di atas 40%.

Kemasan *straw water jacket* (41,25%) sampai penyimpanan 108 jam memiliki kemampuan yang hampir sama dalam mempertahankan sperma motil dengan kemasan *pool* (38,33%), tetapi keduanya nyata ($P < 0,05$) lebih baik dibandingkan straw bebas (25,42%). Hasil penelitian ini lebih tinggi dibandingkan Roca *et al.* (2004) karena pengemasan *straw water jacket* mampu bertahan sampai 96 jam (4 hari) dengan persentase motilitas 52% dalam pengencer tris kuning telur selama penyimpanan 5°C, sedangkan pada kemasan *pool* dari hasil penelitian ini mampu mempertahankan motilitas sampai 96 jam penyimpanan sebesar 43,75%. Hasil ini mirip dengan Arisandy (2003) yang melaporkan bahwa spermatozoa mampu mempertahankan motilitas sampai 96 jam (51,67%) pada semen cair domba garut.

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi daya tahan spermatozoa *in vitro* adalah sifat fisik dan kimiawi bahan pengencer, kadar pengenceran, suhu dan cahaya dalam perlakuan dan penyimpanan semen, pH, tekanan osmotik, elektrolit dan non elektrolit (Toelihere, 1993).

Persentase motilitas spermatozoa dengan kemasan straw *water jacket* memiliki daya tahan paling lama karena diduga saat berlangsung penyimpanan semen dalam lemari es dapat tercipta *microenvironment* (lingkungan mikro) yang lebih stabil dibandingkan kemasan lainnya. Penyimpanan dengan melibatkan media air secara teknis mampu beradaptasi terhadap perubahan suhu yang drastis. Hal ini didukung oleh pernyataan Hunter (1995) yang menyatakan bahwa insulasi sangat penting untuk mencegah pendinginan semen secara cepat, karena spermatozoa mamalia peka terhadap kejutan temperatur.

Kemasan *pool* memiliki permukaan kemasan yang lebih luas sehingga pemaparannya lebih besar dan homogenisasi setiap akan dilakukan pengamatan mempengaruhi daya tahan spermatozoa. Hal ini didukung oleh pernyataan Aminah dan Layla (2001) bahwa kematian spermatozoa bisa disebabkan oleh guncangan atau pengocokan yang keras.

Pengaruh Interaksi antara Konsentrasi dan Penyimpanan Terhadap Motilitas Spermatozoa. Hasil analisis statistik menunjukkan terjadi interaksi antara konsentrasi dan kemasan terhadap motilitas spermatozoa. Persentase spermatozoa motil yang menunjukkan daya tahan lebih lama terdapat pada kemasan straw *water jacket* dengan konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ (44,59%) selama 120 jam penyimpanan. Namun, dari Ilustrasi 3 dapat dilihat bahwa pada semua kemasan dalam kedua konsentrasi mampu dipertahankan dengan baik selama 72 jam penyimpanan, dengan kisaran 40-60%.

KESIMPULAN

1. Daya tahan spermatozoa dalam mempertahankan persentase motilitas lebih tinggi pada konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ spermatozoa ml}^{-0.3}$ dibandingkan dengan konsentrasi $100 \times 10^6 \text{ spermatozoa ml}^{-0.3}$ setelah penyimpanan pada suhu 4-5°C.
2. Penyimpanan dalam straw *water jacket* lebih baik dalam mempertahankan persentase motilitas lebih dari 40% selama 108 jam dengan penurunan yang relatif lebih stabil.
3. Terdapat korelasi positif antara variasi kemasan dan konsentrasi spermatozoa.

Berdasarkan kesimpulan diatas untuk pelaksanaan inseminasi buatan kambing dapat disarankan :

1. Penyimpanan sampai 48 jam dapat menggunakan konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ spermatozoa ml}^{-0.3}$ dan $100 \times 10^6 \text{ spermatozoa ml}^{-0.3}$ tetapi jika = 48 jam bisa menggunakan $50 \times 10^6 \text{ ml}^{-0.3}$ dengan inseminasi ganda.
2. Untuk pelaksanaan IB menggunakan semen cair, dapat menggunakan konsentrasi $50 \times 10^6 \text{ spermatozoa ml}^{-0.3}$ dan $100 \times 10^6 \text{ spermatozoa ml}^{-0.3}$ dalam berbagai kemasan (straw bebas, *pool* dan straw *water jacket*) selama 72 jam penyimpanan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aminah, S. dan Z. Layla. 2001. Daya tahan hidup spermatozoa kambing dengan menggunakan larutan pengencer tris, air kelapa, skim dan susu skim. Buletin Teknik Pertanian 6 (2). Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Jakarta.
- Arifiantini, I. 1998. Pengaruh Jenis Bahan Pengencer dan Variasi Jumlah Sel terhadap Motilitas Spermatozoa pada Semen Cair Domba. Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Bogor. (Tidak diterbitkan)
- Arisandy, R. 2003. Pengaruh penambahan Maltosa, Gliserol, dan Kombinasi keduanya kedalam Pengencer Semen Tris-kuning telur. Progam Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. Tidak Diterbitkan.
- Barth, A.D and R.J. Oko. 1989. Abnormal Morfology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press. Ames. Iowa.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 2000. Applied Animal Reproduction. 5thEd.. Mississippi State University. Hal : 24-143.
- Evan, G. and W.M.C Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination at Sheep and Goats. Theriogenology 42: 849-858

Hafez, B. and
Cycles
Anim
Lippinc

Hunter R.H.
Reprod
Institut

Roca, J., J.A. C
Vazquez
fertility
goat sp
extender
25: 147-

Sorenson Jr. A.J.

Hafez, B. and E.S.E. Hafez. 2000. Reproductive Cycles. Dalam: Reproduction in farm Animals. 7th Ed. E.S.E.Hafez (Editor). Lippincot Williams and Wilkins. Philadelphia.

Hunter R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Penerbit Institut Teknnologi Bandung, Bandung.

Roca, J., J.A. Carrizossa, I. Canpos, A. Lafuente, J.M. Vazquez, and E. Martinez. 1997. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. Small Rumin. Res., 25: 147-153.

Sorenson Jr. A.M. 1979. Laboratory Manual for Ani-

mal Reproduction. 4th Ed. American Press. Boston.

Steel R.G.D. dan J.H. Torrie. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta. Diterjemahkan oleh B. Sumantri.

Tambing, S.N. 1999. Efektivitas Berbagai Dosis Gliserol di dalam Pengencer Tris dan waktu Ekuilibrasi terhadap kualitas semen beku kambing Pernakan Ettawah. Tesis. Bogor: Progam Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.

Toelihere, M.R. 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Penerbit Angkasa. Jakarta.